

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

Estudios moleculares del gen *IytA* de *Streptococcus pneumoniae*, y otros estreptococos relacionados, y su aplicación en epidemiología

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Morales Areizaga

Directores

Antonio Javier Martín Galiano
Ernesto García López

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**Estudios moleculares del gen *lytA* de
Streptococcus pneumoniae, y otros
estreptococos relacionados, y su
aplicación en epidemiología**

TESIS DOCTORAL

MARÍA MORALES AREIZAGA

**Centro de Investigación Biomédica en Red
de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) y
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III

**Estudios moleculares del gen *lytA* de
Streptococcus pneumoniae, y otros
estreptococos relacionados, y su
aplicación en epidemiología**

Tesis doctoral presentada por
María Morales Areizaga
para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Directores:

Dr. Antonio Javier Martín Galiano
Instituto de Salud Carlos III

Dr. Ernesto García López
Centro de Investigaciones
Biológicas, CSIC

MADRID, 2014

Tengo que agradecer mucho a muchas personas, sin las cuales yo no habría podido conseguir hacer esta Tesis pero, en primer lugar quiero hacerlo al Prof. Ernesto García, el mejor jefe que he podido y que voy a tener, de eso estoy totalmente segura. Muchas gracias Ernesto, gracias porque si no hubiera sido por ti habría dejado la Tesis al volverme a Donosti, tú me has animado y me has hecho ver que todo mi trabajo era merecedor de formar parte de una Tesis. Gracias por haberme acogido y por haberme hecho sentir realmente valorada. Me has puesto el listón demasiado alto.

Por supuesto, agradecer a mi otro director, el Dr. Javier Martín Galiano, tus sabios conocimientos han enriquecido enormemente esta Tesis.

Quiero agradecer también al Dr. Pedro García, te debo gran parte de mis conocimientos, de mis habilidades en el trabajo de laboratorio y de mi *curriculum*.

No quisiera olvidarme del Dr. Daniel Llull, sin el cual nunca hubiera llegado a formar parte de este extraordinario grupo, gracias por fijarte en mí.

Por supuesto, agradecerle infinitamente a Ana González, gracias Ana, gracias por estar siempre pendiente de mí, por enseñarme, por contagiarme tu alegría y por haberme hecho estar siempre tan agusto. ¡Cómo te he echado de menos!

Gracias al Prof. Rubens López, imenudo equipazo (gran familia) formaste!

Gracias también a los Dres. Eduardo Díaz, Auxi Prieto y Jose Luis García, gracias a vosotros mantuve el contacto con el trabajo en el laboratorio y al final me reenganché al mundo de la investigación.

Un especial agradecimiento a mis compañeros de laboratorio. Gracias Beatriz Piñeiro y Susana Ruíz, sin vosotras no creo que hubiera conseguido acabar todo mi trabajo. Gracias Miri, Elisa, Susana Campuzano, Miriam y Jose Yuste, habéis sido unos grandes compañeros, siempre dispuestos a ayudar en todo. Rober, mil gracias por animarnos diariamente el laboratorio, ha sido una gozada compartir contigo el laboratorio y gracias de parte de Sara por medirme los cultivos a última hora (así podía salir antes de la guarde). Gracias Elo por todo el trabajazo que nos ahorras, eso es impagable. Gracias también a Violeta, gracias por todos tus sabios consejos de pediatría en mis primeros meses como mamá.

Otro agradecimiento especial para Blas, Juan, Iria, el Niño, Gonn, Luque, Ana G., Isabelita e Irene, por todas esas cañas y noches increíbles que he pasado con vosotros, mi primera etapa entre los Rubenes fue estupenda gracias a vosotros. No me olvido de Andrés, Virgi, Ife, Javier, Esther, María Esteban y Nina, con vosotros también he compartido alguna que otra noche alegre. Gracias a Bea, Laura, Valle y, en especial, a Ana y a Lorein, por todos los ratos de descanso que hemos compartido y por lo mucho que he aprendido de perros, gatos, cosas *frikies*, recetas, etc., el día a día de trabajo no hubiera sido igual sin vosotras. Gracias también a Julia, Carlos, Zaira, Begoña,

Carmen, Fernando, Manuel y Tere por los ratos que hemos compartido en nuestra hora de la comida, desde luego era difícil comer sólo.

Gracias a la Dra. Josefina Liñares y Carmen Ardanuy por toda esa cantidad de cepas de neumococo, sin las cuales, no habría Tesis.

Millones de gracias a mis padres, gracias por vuestro esfuerzo en procurar que estudiara lo que quería y donde quería, por todo de lo que os habéis privado y porque gracias a vosotros soy lo que soy ahora. Gracias a mis herma@s, Elena, Lucía y Susete, gracias por aguantarme. Susete, gracias por tu asesoramiento artístico en la portada. Gracias Lili por todo tu cariño, me encantaría que pudieras estar aquí! Gracias a Jesús y a Merche, sin vuestra ayuda con Sara no hubiera podido acabar el máster.

Hernán, es imposible agradecerte todo lo que has hecho y haces por mí día tras día... eres el mejor, me siento la más afortunada por tenerte a mi lado, sin ti todo esto no sería posible. Gracias por aguantarme, por apoyarme en todo incondicionalmente, por animarme, por creer en mí, por entregarte al cien por cien y sin dudar en ayudarme en todo lo que me propongo, ... , no sé si podré agradecértelo lo suficiente. Gracias a mi "Gordi", gracias por el ánimo que recibo todas las mañanas cuando te despiertas con esa preciosa sonrisa y por todos esos "te quiero mucho Mami", gracias por los enormes besos que he recibido todas estas noches a pesar de no haber podido estar contigo en todo el día.

¡Gracias a todos!

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación del CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES).

A Hernán

A Sara y a Julia

A mis padres

“Debemos usar el tiempo sabiamente y darnos cuenta de que siempre es el momento oportuno para hacer las cosas bien”

Nelson Rolihlahla Mandela

ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (UIPAC) (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html#nt>), en esta Tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

aa, aminoácido(s).
Amp, ampicilina.
ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo o *American Type Culture Collection*.
BD, base(s) de datos.
BSA, seroalbúmina bovina o *bovine serum albumin*.
CCUG, Colección de Cultivos, Universidad de Gotenburgo o *Culture Collection, University of Göteborg*.
CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.
CBD, dominio de unión a colina (o *choline-binding domain*) característico de las proteínas de unión a colina o CBPs.
CBP, proteína(s) de unión a colina o *choline-binding proteins*.
CBR, repetición(es) de unión a colina o *choline-binding repeats*.
C-LytA, dominio de unión a colina (CBD) de la NAM-amidasa LytA.
CpH8, medio C ajustado a pH 8.0.
C+Y, medio CpH8 conteniendo 0.08% de extracto de levadura.
C+Y+Cho, medio CpH8 conteniendo 0.08% de extracto de levadura y 2% de cloruro de colina.
cpm, cuentas por minuto.
CPS, polisacárido capsular.
CWD, dominio(s) de unión a la pared celular o *cell wall-binding domains*.
DEAE, dietilaminoetanol.
Doc, desoxicolato sódico.
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético.
IDIBELL, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona).
IPTG, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
IS, secuencia de inserción.
LB, medio de cultivo Luria-Bertani.
MLSA, análisis por secuenciación multilócica o *multilocus sequence analysis*.
MLST, tipificación por secuenciación multilócica o *multilocus sequence typing*.
NAM-amidasa, *N*-acetilmuramyl-L-alanina amidasa (EC 3.5.1.28).
NC, no capsulada.
nt, nucleótido(s).
NT, no tipificable.
Opt, optoquina.
ORF, marco de lectura abierto u *open reading frame*.
pb, par(es) de bases.
PCR, reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction*.
PCV, vacuna polisacáridica antineumocócica conjugada.
PED, distancias evolutivas deducidas del alineamiento entre dos secuencias o *pairwise evolutionary distances*.
PFGE, electroforesis en gel en campo pulsado o *pulsed-field gel electrophoresis*.
Ply, pneumolisina.
^R, resistente.
RF, forma replicativa.
SDP, posiciones determinantes de especificidad o *specificity determining positions*.

SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

SLV, *single locus variant(s)*.

SMG, estreptococo(s) del grupo mitis.

SP, tampón fosfato sódico 20 mM ajustado a pH 6.9.

SPSH, tampón SP (pH 8.0) conteniendo β -mercaptoetanol (20 mM) y NaCl (0.15 M).

ST, secuencitipo o *sequence type*.

^T, cepa tipo.

TA, ácido(s) teicoico(s).

LTA, ácido(s) lipoteicoico(s).

TAE, tampón para electroforesis de ADN en geles de agarosa. Contiene Tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM; pH 8.1.

TE, tampón conteniendo 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA.

THY, medio Todd-Hewitt conteniendo 0.4% de extracto de levadura.

U, unidad de actividad enzimática.

ufc, unidades formadoras de colonias.

ÍNDICE

SUMMARY	i-x
I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL GÉNERO <i>STREPTOCOCCUS</i>	3
1.1. <i>Estreptococos del Grupo Mitis (SMG)</i>	4
2. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	7
2.1. <i>Características generales</i>	7
2.2. <i>Importancia clínica y prevención de la infección neumocócica</i>	8
2.3. <i>Técnicas de tipificación</i>	11
2.4. <i>Proteínas de unión a colina</i>	16
2.4.1. <i>La autolisina LytA de neumococo</i>	20
2.4.2. <i>Las endolisinas tipo LytA de los fagos atemperados de neumococo</i>	22
2.4.3. <i>Las enzimas líticas tipo LytA de otros SMG y sus profagos</i>	24
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	33
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	42
3. TÉCNICAS DE ADN	42
3.1. <i>Preparación de ADN cromosómico</i>	42
3.2. <i>Preparaciones de ADN plasmídico</i>	43
3.3. <i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	44
3.4. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	44
3.5. <i>Secuenciación de ADN</i>	44
3.6. <i>Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología molecular</i>	45
4. CLONACIÓN DE GENES <i>LYT A</i> Y OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> HIPERPRODUCTORAS ...	45
5. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS	45
5.1. <i>Expresión y purificación de proteínas LytA</i>	45
5.2. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS</i>	46
6. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD EN DOC O TRITÓN X-100	46
7. SENSIBILIZACIÓN DE CULTIVOS A LA AUTOLISINA AÑADIDA EXTERNAMENTE	47
8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	47
8.1. <i>Aislamiento y purificación de paredes radiactivas</i>	47
8.2. <i>Ensayo de actividad NAM-amidasa sobre paredes de S. pneumoniae</i>	48
8.3. <i>Ensayo de actividad enzimática sobre cultivos bacterianos</i>	48
9. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE FAGOS ATEMPERADOS.....	49
10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	49
10.1. <i>Análisis filogenético</i>	49

10.2. Análisis estadístico	49
10.3. Técnicas de modelado 3D y predicción de estructura-función de proteínas	50
10.4. Otros	51
IV. RESULTADOS	53
1. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL GEN <i>LYTA</i> EN ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO MITIS Y SUS FAGOS	55
1.1. Secuencias de <i>lytA</i> disponibles en las bases de datos	55
1.2. Variabilidad genética de <i>lytA</i>	58
1.2.1. Polimorfismo de los alelos <i>lytA_{Spn}</i>	58
1.2.2. Distribución de los sitios polimórficos en genes <i>lytA</i> no neumocócicos	59
1.2.3. Relaciones filogenéticas entre los genes <i>lytA</i> de profagos y hospedador	63
2. VALIDACIÓN DE UNA TIPIFICACIÓN ALTERNATIVA DE AISLADOS DE <i>S. PNEUMONIAE</i> BASADA EN LOS GENES <i>LYTA</i> Y <i>GALU</i>	66
2.1. Utilización de los genes <i>lytA</i> y <i>galU</i> en estudios filogenéticos de 284 cepas de neumococo	66
2.2. Análisis estadístico comparativo entre el MLST y la tipificación con los genes <i>lytA</i> y <i>galU</i>	79
3. EL GEN <i>LYTA</i> DE LOS FAGOS ATEMPERADOS DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	81
3.1. Detección y tipificación de fagos atemperados en aislados clínicos	83
3.2. Comparación de cepas por secuencitipo, serotipo y presencia de alelos <i>lytA_{PPH}</i>	86
3.3. Similitudes entre <i>lytA_{PPH}</i> y <i>lytA_{Spn}</i>	86
4. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD DE LAS NAM-AMIDASAS <i>LYTA</i> DE <i>S. PNEUMONIAE</i> Y OTROS SMG	92
4.1. Genes <i>lytA</i> de nuevos SMG	96
4.2. Características de las estirpes de SMG donde se han encontrado nuevos genes de tipo <i>lytA</i>	100
4.2.1. Curvas de crecimiento y características fenotípicas de <i>S. infantis</i> SK970, <i>S. mitis</i> SK597, <i>S. mitis</i> SK1073, <i>S. oralis</i> SK313 y <i>S. oralis</i> ATCC 49296	100
4.2.2. Presencia de colina en la pared celular	103
4.2.3. Inducción de fagos atemperados	104
4.3. Actividad de los alelos <i>LytA_{Spn}</i> , <i>LytA_{SMG}</i> y <i>LytA_{SPH}</i> de las estirpes estudiadas en esta Tesis	105
4.3.1. Actividad in vitro de los alelos <i>LytA_{Spn}</i> , <i>LytA_{SMG}</i> y <i>LytA_{SPH}</i>	106
4.3.2. Actividad sobre cultivos bacterianos	109
5. LOS DIVERSOS CLADOS DE <i>LYTA</i> PRESENTAN DIFERENTES RESIDUOS EN POSICIONES ESPECÍFICAS QUE COLOCALIZAN EN LA ESTRUCTURA	112
6. APORTACIÓN AL POSIBLE ORIGEN DEL GEN <i>LYTA</i> DE <i>S. PNEUMONIAE</i> Y OTROS SMG	117
V. DISCUSIÓN	131
1. POLIMORFISMO DEL GEN <i>LYTA</i> EN ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO MITIS Y SUS FAGOS	133

2. LOS DIFERENTES CLADOS DE <i>LYTA</i> PRESENTAN DIFERENTES RESIDUOS EN POSICIONES ESPECÍFICAS QUE COLOCALIZAN EN LA ESTRUCTURA	153
3. UTILIDAD DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES <i>LYTA</i> Y <i>GALU</i> EN ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y SU APLICACIÓN EN LA TIPIFICACIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	154
4. CONTEXTO GENÓMICO DEL GEN <i>LYTA</i> EN <i>S. PNEUMONIAE</i> Y OTROS <i>SMG</i>	157
VI. CONCLUSIONES	161
VII. BIBLIOGRAFÍA	165
VIII. ANEXO	189

SUMMARY

INTRODUCTION: The genus *Streptococcus* includes more than 75 species divided into 5 groups on the basis of biochemical tests: “Mutans”, “Salivarius”, “Anginosus”, “Sanguinis” and “Mitis” (Facklam, 2002). The separation between the last two groups is highly controversial; therefore, in this work we have used the most widespread term “*Streptococcus* of the Mitis Group” (SMG) which includes both the “Sanguinis” and the “Mitis” groups. Currently, at least 18 species are part of the SMG and their identification is central to prescribe the most appropriate antimicrobial therapy. However, this is often challenging because the members of the SMG closely resemble each other, this is, some species share more than 99% 16S rRNA sequence identity (Kawamura *et al.*, 1995; Arbiqúe *et al.*, 2004). The underlying reasons of this problem remain unclear but it is reasonable to assume that horizontal transfer of genetic material plays an important role since most SMG are naturally competent (Håvarstein, 2010). *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is the most important SMG pathogen and it is closely related to other commensal SMG of the oral cavity and upper respiratory tract such as *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus infantis*, which rarely cause disease (Maeda *et al.*, 2010, 2011; Mitchell, 2011). A reasonable explanation for the large differences in virulence potential found among these members of the SMG is not available. Actually, many gene products that have been described as *S. pneumoniae* virulence factors are also present in *S. mitis* and *S. oralis* (Hakenbeck *et al.*, 2009; Denapaite *et al.*, 2010; Madhour *et al.*, 2011).

Pneumococcus is a major cause of bacterial sepsis and the main etiologic agent of acute otitis media, community-acquired pneumonia and non-epidemic bacterial meningitis (Bogaert *et al.*, 2004; Wardlaw *et al.*, 2006). According to World Health Organization (WHO), estimates of sepsis or pneumonia in neonates and pneumonia in older children account for 29% of the 10.6 million yearly deaths in children younger than 5 years, being pneumococcus the most common cause of severe pneumonia among children in developing countries as well as in children (http://www.unicef.org/Spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf) and adults in Europe and the United States. Pneumococcal epidemiological studies are of great interest due to the high clinical incidence of this bacterium, the appearance of multiresistant strains and the need to study the efficacy of pneumococcal vaccines. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing

(MLST) are widely employed for pneumococcal typing. Although these techniques are powerful, they undergo some restrictions that prevent the implementation in the clinical setting since MLST is expensive whereas PFGE is time-consuming and comparison of results from different laboratories is far from trivial. Furthermore, MLST does not detect changes that may take place in other genomic regions and, as a consequence, there may have a great variability among strains corresponding to the same sequence type (Silva *et al.*, 2006; Hiller *et al.*, 2010; Croucher *et al.*, 2011). Therefore, rapid, easy, low-cost, and reliable techniques are demanded. For this purpose, one of the main goals of the current study was to validate an alternative typification procedure that involves sequencing other genes.

The typical autolysis at the end of stationary phase and bile solubility of pneumococcus are triggered by the major pneumococcal autolysin, LytA, an *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (NAM-amidase; EC 3.5.1.28) (García *et al.*, 1985, 1986). This NAM-amidase is an important virulence factor (Berry and Paton, 2000; Ng *et al.*, 2002; Orihuela *et al.*, 2004; Hirst *et al.*, 2008; Moscoso *et al.*, 2010, 2011; Ramos-Sevillano *et al.*, 2012, 2013). The pneumococcal LytA (LytA_{Spn}) exhibits a modular organization whereby the amino-terminal domain acts as the enzyme's catalytic region and the carboxy-terminal domain (choline-binding domain: CBD) features a tandem of 7 repeated motifs involved in recognizing the choline residues present in the cell wall teichoic acids (López and García, 2004; López *et al.*, 2004). The N-terminal domain of LytA enzymes belong to the *Amidase_2* domain family (PF01510) (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). It is well known that *Streptococcus pseudopneumoniae* and some other SMG also synthesize LytA-like NAM-amidases. However, and in sharp contrast with LytA_{Spn}, the LytA_{SMG} enzymes were inhibited by 1% sodium deoxycholate (Doc) (Obregón *et al.*, 2002). As a consequence of this inhibition, SMG isolates do not lyse in the presence of Doc, although they may still harbor a *lytA*-like gene (Fenoll *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1992a; Whatmore *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2002; Balsalobre *et al.*, 2006; Llull *et al.*, 2006). Moreover, whereas *lytA*_{Spn} alleles are 957-pb long, *lytA* alleles from SMG (*lytA*_{SMG}) are 951-pb long because of a characteristic 6-pb deletion between nucleotide positions 868 and 873. This deletion is located in the sixth repeated motif of the LytA_{Spn} CBD and codes for Thr₂₉₀-Gly₂₉₁ (Obregón *et al.*, 2002).

Prophages seem to play an important role in *S. pneumoniae* biology, since it is now clear that more than half of all clinical pneumococcal isolates are lysogenic (Ramírez *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2009). Especially important are the enzymes

involved in cell lysis (endolysins) that are encoded by these phages. Interestingly, all pneumococcal prophages reported to date code for a 318-amino-acid (aa)-long NAM-amidase (LytA_{PPH}) that closely resembles the bacterial LytA enzyme (Romero *et al.*, 1990; Obregón *et al.*, 2003a, b; Frias *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009). Two temperate bacteriophages of *S. mitis*, ϕ B6 and ϕ HER, also encode a LytA_{Spn}-like endolysin (designated as LytA_{SPH}) of 318 aa residues (Romero *et al.*, 2004), whereas the EJ-1 inducible prophage isolated from *S. mitis* 101/87 harbors a gen (*ejl*) with the characteristic deletion of *lytA*_{SMG} alleles (Díaz *et al.*, 1992b). One of the major aims of this Thesis was to carry out a detailed study of the genetic variability of *lytA* and its genomic context in an attempt to learn more about the evolutionary origin of this gene as well as to determine which are the amino acids implicated in the functional differences among the LytA alleles.

MAJOR FINDINGS: In this Memoire, a broad study of the *lytA* gene polymorphism (and of the protein encoded by this gene, LytA) was performed. Firstly, all the available *lytA* sequences were collected from public databases. These sequences corresponded to 71 alleles (26 *lytA*_{Spn}, 23 *lytA*_{SMG}, 19 *lytA*_{PPH}, and 3 *lytA*_{SPH}). Complete *lytA* alleles from SMG or pneumococcal prophages were aligned and the polymorphic site distribution was determined. A multiple sequence alignment was carried out with all of these alleles and this comparison showed that the *lytA*_{SMG} and *lytA*_{PPH} clades were much more polymorphic than those from *S. pneumoniae*, the variable sites appearing along the whole sequence, in contrast to what was noted in the *lytA*_{Spn} clade. Although two peaks of variability around nucleotide positions 767 and 923 were detected among *lytA*_{Spn} alleles, the most remarkably polymorphic region occurs near the middle of the gene (around position 453). Thus, polymorphism between nucleotide positions 421 and 480 accounts for an estimated pairwise evolutionary distance (PED) of 18.9%, in strong contrast to the PED value <3.5% characteristic of the full *lytA*_{Spn} alleles. Due to this polymorphic region, a phylogenetic analysis revealed that the *lytA*_{Spn} alleles can be divided into two families (designated Fam_A and Fam_B). Fam_A and Fam_B *lytA* alleles include, respectively, a BamHI and HincII restriction target. However, *lytA*_{SMG} sequences differed considerably in this polymorphic region with respect to *lytA*_{Spn} and, therefore, it was not possible to classify them into any of these two families. In addition, only two *lytA*_{PPH} alleles had sequences identical to those characteristic of Fam_A a Fam_B *lytA* alleles while the remaining *lytA*_{PPH} alleles were a mosaic of both families. These data indicated that

recombination events had taken place between phage and host *lytA* genes. To further extend this study, the *lytA* gene of 164 pneumococcal clinical isolates (corresponding to serotypes 1, 3 and 19A) was sequenced. Overall, a total of 30 *lytA_{Spn}* alleles (corresponding to 15 *LytA_{Spn}* alleles) were found. The presence of temperate bacteriophage and their corresponding *lytA_{PPH}* sequences were determined in these clinical isolates. Prophage analysis was performed using a PCR amplification technique previously described by Romero *et al.* (2009) and inducible prophages were detected by the direct addition of mitomycin C to the culture. Forty six percent of the isolates harbored prophages and 60% of them were inducible by mitomycin C, in agreement with previous findings (Romero *et al.*, 2009). Using specific primers designed to detect and sequence any *lytA_{PPH}* allele, 10 new *lytA_{PPH}* alleles were found. All of them were 957-bp long (encoding a 318 amino acid residues protein). This *lytA_{PPH}* collection allowed the detection of novel recombination events between phage and host *lytA* genes. Multiple sequence alignments of the *lytA_{Spn}* and *lytA_{PPH}* alleles made possible to detect a highly probable recombination event between *lytA_{26_PPH}* and *lytA_{25_Spn}* giving rise to *lytA_{22_PPH}*. This finding strongly supports the hypothesis that the acquisition of bacterial genes by phages accelerate the evolution of these genes including those involved in disease process like the NAM-amidase LytA.

To continue the study of *lytA* polymorphism, a new search of databases revealed that several strains of SMG whose genomes have been recently sequenced, possessed peculiar *lytA* genes. These *lytA* genes belonged to strains of *S. mitis*, *S. infantis* and *S. oralis*. This is the first time that a *lytA*-like gene is reported in *S. infantis* or *S. oralis*. The comparison of these new LytA proteins and the previously known NAM-amidases showed that: 1) the alleles of *S. mitis* SK1073 and *S. infantis* SK970 were 314 aa-long, that of *S. oralis* SK313 was 321 aa-long, whereas the alleles of *S. mitis* SK597 and *S. oralis* ATCC 49296 were 316 and 318 aalong, respectively; 2) these new alleles were very divergent from the rest of the known alleles (PED values of 40–50%). Note that previous alleles showed PED values $\leq 21\%$; 3) the numerous aa changes of these new alleles were mainly located at the CBD of the protein; 4) these alleles form (with the exception of *LytA_{SK597}*) a clade independent of the rest of the LytA alleles. The novel alleles were cloned and hiperexpressed, and the NAM-amidases were purified and their *in vitro* activity determined. Surprisingly, all these alleles presented a very low specific activity (3–30% with respect to that of *LytA_{R6}*) and the corresponding strains did not lyse in the presence of 1% Doc or Tri-

ton X-100. All these strains of SMG lysed in presence of purified LytA_{R6} indicating that they contain choline molecules in their cell walls. In addition to the sequence peculiarities of the *lytA* gene and the corresponding protein, these alleles also exhibited distinct characteristics: a) *S. mitis* SK597 did not autolyse at the end of the stationary phase, even though it has a bacterial type *lytA* allele; b) *S. oralis* SK313 and *S. mitis* SK1073 have phage *lytA* genes but did not lyse in the presence of mitomycin C. This could be explained considering the fact that these genes belong to non-viable (*i.e.*, noninducible) prophages; c) *S. oralis* ATCC 49296 harbors two phage-like *lytA* genes (*lytA*_{Sor_1} and *lytA*_{Sor_2}) and this strain lysed in the presence of mitomycin C, although none of these *LytA* alleles (*LytA*_{Sor_1} or *LytA*_{Sor_2}) was unable to induce lysis when independently added to a growing culture; d) *S. infantis* SK970 has a phage *lytA* gene and lysed at the end of the stationary phase and in the presence of 1% Doc; 5) none of these alleles were able to lyse their own strain.

To get insight into the causes of the different activities among the *LytA* subfamilies, the specificity determining positions (SDP) of clades *LytA*_{PPH}, *LytA*_{SPH} and *LytA*_{SMG} as compared to *LytA*_{Spn} were computed. Only two of the 54 SDP were fully specific of *LytA*_{Spn}, therefore, these two SDP (H32 and C60) could be considered responsible for the differences between *LytA*_{Spn} and the rest of clades. Then, a structural model was built based on the endolysin XlyA of a *Bacillus subtilis* defective prophage (PBSX) (Longchamp et al., 1994; Low et al., 2011). The three-dimensional structure of the CBD of *LytA* had been already resolved (Fernández-Tornero et al., 2001, 2002a, b). The subfamily-characteristic SDP were localized on this structural model and a clade-specific positional correlation was found. The differences in the CBD among clades suggested that there could be a different degree of choline affinity and self-interaction. In addition, the substitutions in the NAM-amidase domain suggest different catalytic properties between the *LytA* subfamilies. With the aim of substantiating these differences, the putative active site of the protein was predicted. As an universal fact reported for more than 90% protein families, it was assumed that the putative active site corresponded to the most bulky pocket in the structural model of the catalytic domain described in this study. The relative degree of aa conservation was also determined and the results showed that most of the conserved aa were located around this pocket, which reinforces the prediction of such pocket corresponding to the active site of the enzyme. Furthermore, the SDP that are located closest to the pocket were the corresponding to the

LytA_{SMG} clade indicating that LytA_{SMG} alleles could have different substrate affinity than the rest of LytA alleles.

One of the goals of the current study was to validate a novel gene sequencing procedure alternative (or complementary) to the MLST. For this purpose, an alternative procedure consisting of two well-characterized *S. pneumoniae* genes, *i.e.*, *lytA* and *galU* (encoding a UDP-glucose pyrophosphorylase) was proposed. First, a phylogenetic analysis of the *lytA* and *galU* genes was carried out in a collection of 284 strains. The results obtained suggested that a combined analysis of *lytA* and *galU* genes may provide information similar to that afforded by the whole genome. For a definite validation of this typing procedure, a detailed statistical analysis was performed. Two approaches (continuous and discrete) were carried out. The continuous approach showed that the use of *lytA* alleles, the use of *galU* alleles or a combination of both do not parallel the genomic distances between strains. For the discrete approach, all the strains were classified according to their *lytA* alleles, *galU* alleles or a combination of both genes, and it was determined whether each of them corresponded exclusively to one lineage or to one serotype. The concatenated *lytA-galU* and the MLST gave accurate results at lineage level and both techniques were statistically similar at serotype level. Consequently, using only two genes, the *lytA-galU* system appears to be a good discrete method for serotype prediction that saves money, time and effort with respect to the 7 genes used in the MLST.

Finally, the genes flanking *lytA* and their joint transmission were studied to enable a better understanding of the evolution of this gene and its involvement in the taxonomy and phylogeny of the genus *Streptococcus*. Denapaité *et al.* (2010) described a direct repeat located 3' of the *dinF* gene (corresponding to the gene located immediately upstream of the *lytA* gene) and 3' of the *ply* (pneumolysin) gene in the *S. pneumoniae* R6 strain. These authors suggested that these repeats would represent the integration site of the *ply/lytA* region. In this Memoire, the study of this repeated sequence was extended to all the strains whose genome sequences are currently known. Actually, we found that this repeat is slightly longer than previously proposed (Denapaité *et al.*, 2010), this is, 104 bp rather than 94 bp. Then, the study was broadened to other streptococcal species closely related to the pneumococcus. It was found that only the streptococcal strains harboring a bacterial type *lytA* gene, also harbor a *ply*-like gene and that the second repeat is always located 3' end of this gene. Next, the DNA sequences located 3' of *ply* or 5' of *lytA* were analyzed, and it was found that both regions were highly conserved among different strains.

These findings fully confirmed the proposal that the repeated sequence correspond to the integration site of the *ply/lytA* island. Besides, a peculiar case, *i.e.*, the serotype 3 *S. pneumoniae* A45 strain, was found while we were analysing the *ply/lytA* region of the pneumococcal strains whose genomic sequences were available. This strain appears to have suffered a profound reorganization of its genome consisting of the inversion of a large region with respect to the D39 strain, and the transposition of another region. Notably, it was also found that the *lytA* and *ply* genes from strain A45 were fused owing to an extensive deletion of the intervening region between both genes. The predicted LytA-Ply hybrid protein will probably be enzymatically inactive. Since a previous study by Whatmore *et al.* (1999) had showed that equine isolates of pneumococcus possess, as the A45 strain, a serotype 3 capsule and have the same *ply-lytA* fusion, the origin of the A45 strain was investigated and the results strongly suggested that, in spite of what is described in the databases, A45 was also isolated from an infected horse.

CONCLUSIONS: This study shows that the *lytA*_{SPH} clade is the most polymorphic, followed by the *lytA*_{PPH} and *lytA*_{SMG} clades, while the *lytA*_{Spn} one is well conserved. In the same way, the polymorphism of *lytA*_{PPH}, *lytA*_{SPH} and *lytA*_{SMG} appear along the whole gene (or protein), in contrast to the *lytA*_{Spn} alleles in which the polymorphism is mainly located around three nucleotide positions (453, 767 and 923). The most remarkably polymorphic region is located around the position 453. In addition, the present Memoire shows that the *lytA*_{Spn} alleles can be classified into two families (Fam_A and Fam_B) depending on their precise sequence around the position 453. Furthermore, it has been shown that several recombinational events involving the phage and the host have taken place around position 453. These findings strongly support the proposal that phage genes could play an important role in the evolution of bacterial genes involved in disease process, as is the case for the NAM-amidase LytA.

As had been already described for *S. mitis*, this work has documented that strains of *S. infantis* and *S. oralis* also harbor *lytA* genes. Notably, all the novel *lytA* genes of the SMG described here correspond to phage *lytA* genes. These findings reinforce the hypothesis that temperate SMG bacteriophages could play an important role in the spreading of the *lytA* gene among α -hemolytic streptococci. On the other hand, the novel LytA NAM-amidases of the SMG described here are very divergent from those previously identified; this finding, together with data on the lo-

cation of their SDP in the protein model, suggests that the new LytA alleles could have different affinities for the cell wall substrate and that different catalytic properties among the LytA subfamilies may exist.

REFERENCES

- Arbique, J.C., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Quesne, G., Carvalho, M.G.S., Steigerwalt, A.G., *et al.* (2004) Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4686–4696.
- Balsalobre, L., Hernández-Madrid, A., Llull, D., Martín-Galiano, A.J., García, E., Fenoll, A. and de la Campa, A.G. (2006) Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4163–4171.
- Berry, A.M. and Paton, J.C. (2000) Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* **68**: 133–140.
- Bogaert, D., de Groot, R. and Hermans, P.W.M. (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* **4**: 144–154.
- Croucher, N.J., Harris, S.R., Fraser, C., Quail, M.A., Burton, J., van der Linden, M., *et al.* (2011) Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* **331**: 430–434.
- Denapate, D., Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Henrich, B., Maurer, P., *et al.* (2010) The genome of *Streptococcus mitis* B6 – What is a commensal? *PLoS One* **5**: e9426.
- Díaz, E., López, R. and García, J.L. (1992a) Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**: 5508–5515.
- Díaz, E., López, R. and García, J.L. (1992b) EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a *Myoviridae* morphotype. *J. Bacteriol.* **174**: 5516–5525.
- Facklam, R.R. (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 613–630.
- Fenoll, A., Martínez-Suárez, J.V., Muñoz, R., Casal, J. and García, J.L. (1990) Identification of atypical strains of *Streptococcus pneumoniae* by a specific DNA probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: 396–401.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G. and Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1020–1024.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G. and Romero, A. (2002a) Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* **321**: 163–173.
- Fernández-Tornero, C., Ramón, A., Fernández-Cabrera, C., Giménez-Gallego, G. and Romero, A. (2002b) Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the complete choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin. *Acta Crystallogr. Section D, Biol. Crystallogr.* **58**: 556–558.
- Frias, M.J., Melo-Cristino, J. and Ramirez, M. (2009) The autolysin LytA contributes to efficient bacteriophage progeny release in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **191**: 5428–5440.
- García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P. and López, R. (1985) Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 225–230.
- García, P., García, J.L., García, E. and López, R. (1986) Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **43**: 265–272.

- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D. and Brückner, R. (2009) Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 572–586.
- Håvarstein, L.S. (2010) Increasing competence in the genus *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.* **78**: 541–544.
- Hiller, N.L., Ahmed, A., Powell, E., Martin, D.P., Eutsey, R., Earl, J., *et al.* (2010) Generation of genic diversity among *Streptococcus pneumoniae* strains via horizontal gene transfer during a chronic polyclonal pediatric infection. *PLoS Pathog.* **6**: e1001108.
- Hirst, R., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C., Nicotera, P., Andrew, P. and O'Callaghan, C. (2008) *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.* **197**: 744–751.
- Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Miura, H. and Ezaki, T. (1995) Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 406–408.
- Llull, D., López, R. and García, E. (2006) Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1250–1256.
- Longchamp, P.F., Mauël, C. y Karamata, D. (1994) Lytic enzymes associated with defective prophages of *Bacillus subtilis*: Sequencing and characterization of the region comprising the *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene of prophage PBSX. *Microbiology* **140**: 1855–1867.
- López, R. and García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553–580.
- López, R., García, E., García, P. and García, J.L. (2004) Cell wall hydrolases. In *The Pneumococcus*. Tuomanen, E.I., Mitchell, T.J., Morrison, D.A. and Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 75–88.
- Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. y Liddington, R. (2011) Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins. *J. Biol. Chem.* **286**: 34392–34403.
- Madhour, A., Maurer, P. and Hakenbeck, R. (2011) Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Iran. J. Microbiol.* **3**: 58–67.
- Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Coulter, W.A., Mason, C., Dooley, J.S.G., Lowery, C.J. and Moore, J.E. (2010) The viridans group streptococci. *Rev. Med. Microbiol.* **21**: 69–79.
- Maeda, Y., Elborn, J.S., Parkins, M.D., Reihill, J., Goldsmith, C.E., Coulter, W.A., *et al.* (2011) Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) including *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J. Cyst. Fibros.* **10**: 133–139.
- Mitchell, J. (2011) *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol. Oral. Microbiol.* **26**: 89–98.
- Moscoso, M., Domenech, M. and García, E. (2010). Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* **77**: 1052–1064.
- Moscoso, M., Domenech, M. and García, E. (2011) Vancomycin tolerance in Gram-positive cocci. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**: 640–650.
- Ng, E.W., Costa, J.R., Samiy, N., Ruoff, K.L., Connolly, E., Cousins, F.V. and D'Amico, D.J. (2002) Contribution of pneumolysin and autolysin to the pathogenesis of experimental pneumococcal endophthalmitis. *Retina* **22**: 622–632.
- Obregón, V., García, P., García, E., Fenoll, A., López, R. and García, J.L. (2002) Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2545–2554.

- Obregón, V., García, J.L., García, E., López, R. and García, P. (2003a) Genome organization and molecular analysis of the temperate bacteriophage MM1 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**: 2362–2368.
- Obregón, V., García, P., López, R. and García, J.L. (2003b) VO1, a temperate bacteriophage of the type 19A multiresistant epidemic 8249 strain of *Streptococcus pneumoniae*: analysis of variability of lytic and putative C5 methyltransferase genes. *Microb. Drug Resist.* **9**: 7–15.
- Orihuela, C.J., Gao, G., Francis, K.P., Yu, J. and Tuomanen, E.I. (2004) Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **190**: 1661–1669.
- Ramirez, M., Severina, E. and Tomasz, A. (1999) A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3618–3625.
- Ramos-Sevillano, E., Rodríguez-Sosa, C., Díez-Martínez, R., Giménez, M.-J., Olmedillas, E., García, P., *et al.* (2012) Macrolides and β -lactams antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 5534–5540.
- Ramos Sevillano, E. (2013) Enfermedad neumocócica invasiva: mecanismos moleculares de patogenicidad y protección. (Ph.D. Thesis: Universidad Complutense de Madrid).
- Romero, A., Lopez, R. and Garcia, P. (1990) Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB-3 amidase reveals high homology with the major host autolysin. *J. Bacteriol.* **172**: 5064–5070.
- Romero, P., López, R. and García, E. (2004) Characterization of LytA-like *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **186**: 8229–8239.
- Romero, P., García, E. and Mitchell, T.J. (2009) Development of a prophage typing system and analysis of prophage carriage in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1642–1649.
- Silva, N.A., McCluskey, J., Jefferies, J.M.C., Hinds, J., Smith, A., Clarke, S.C., *et al.* (2006) Genomic diversity between strains of the same serotype and multilocus sequence type among pneumococcal clinical isolates. *Infect. Immun.* **74**: 3513–3518.
- Wardlaw, T., Salama, P., Johansson, E.W. and Mason, E. (2006) Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet* **368**: 1048–1050.
- Whatmore, A.M., King, S.J., Doherty, N.C., Sturgeon, D., Chanter, N. and Dowson, C.G. (1999) Molecular characterization of equine isolates of *Streptococcus pneumoniae*: natural disruption of genes encoding the virulence factors pneumolysin and autolysin. *Infect. Immun.* **67**: 2776–2782.
- Whatmore, A.M., Efstratiou, A., Pickerill, A.P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., *et al.* (2000) Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.* **68**: 1374–1382.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL GÉNERO *STREPTOCOCCUS*

El género *Streptococcus* (género tipo) pertenece a la familia *Streptococcaceae*, dentro de la rama de las eubacterias Gram-positivas con bajo contenido (<50 mol%) en G+C (Whiley y Hardie, 2009). Este género agrupa a bacterias de forma esférica u ovoide, de menos de 2 μm de diámetro, que forman cadenas de longitud variable (≥ 2 células) en medios líquidos de cultivo, inmóviles e incapaces de formar endosporas. Prácticamente todas las especies estreptocócicas son anaerobias facultativas, catalasa negativas y poseen un metabolismo fermentativo. Cabe destacar que, con la posible única excepción de *Streptococcus thermophilus*, los estreptococos poseen un importante potencial patogénico tanto para personas como para animales. Un buen número de aislados que habían sido clasificados inicialmente como pertenecientes a este género fueron paulatinamente separados de él constituyendo otros como *Enterococcus* (Schleifer *et al.*, 1985) o *Lactococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984). A partir de ahí, otros aislados definieron nuevos géneros (o fueron incluidos en algunos preexistentes) como *Globicatella*, *Abiotropha*, *Glanulicella* o *Facklamia* así como un grupo de cocos anaerobios estrictos que se incluyen actualmente en los géneros *Gemella*, *Atopobium* o *Ruminococcus* (Facklam, 2002).

Actualmente se conocen más de 75 especies en el género *Streptococcus* (Euzéby, 1997) que se dividen en 6 grupos en función de la secuencia de su ARNr 16S: “Anginosus”, “Bovis”, “Mitis”, “Mutans”, “Piogénicos” y “Salivarius” (Kawamura *et al.*, 1995). Las especies que pertenecen a los grupos Salivarius, Mutans, Anginosus y Mitis constituyen los denominados estreptococos orales. Cuando los estreptococos se multiplican en medios sólidos que contienen sangre, muestran tres tipos de reacciones: β -hemólisis (con un halo definido de desaparición del color de la sangre alrededor de la colonia), α -hemólisis (observándose un halo verdoso alrededor de la colonia) o ausencia de hemólisis. La β -hemólisis, consecuencia de la destrucción de los eritrocitos, es producida por hemolisinas solubles como la estreptolisina L de *Streptococcus pyogenes*; en cambio, la α -hemólisis es debida a la formación de metahemoglobina por acción del H_2O_2 producido por estas bacterias (Barnard y Stinson, 1996). Los estreptococos α -hemolíticos han sido también denominados *viridans* por el color verdoso que muestran las placas alrededor de las colonias (Doern y Burnham, 2010; Maeda *et al.*, 2010). Sobre la base de pruebas bioquímicas, Facklam ha propuesto clasificarlos en 5 grupos: “Mutans”, “Salivarius”, “Anginosus”, “Sanguinis” y “Mitis”, aunque la separación entre los dos últimos gru-

pos es muy controvertida (Facklam, 2002). Por ello, en esta Tesis, se utilizará el concepto más extendido de “Estreptococos del Grupo Mitis” (SMG) que incluye tanto a los estreptococos del grupo Sanguinis como a los del grupo Mitis.

1.1. *Estreptococos del Grupo Mitis (SMG)*

En la actualidad, un mínimo de 18 especies forman parte del grupo de los SMG (Tabla 1) y su identificación precisa en la clínica es de vital importancia a la hora de elegir la terapia antimicrobiana correcta. Sin embargo, esto no siempre es posible debido a la enorme semejanza tanto fenotípica como genotípica entre las especies que integran este grupo. Hay que destacar que todas estas especies comparten una identidad superior al 96% en cuanto al ARNr 16S, que en el caso de *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* y *S. oralis* alcanza el 99% (Kawamura *et al.*, 1995; Arbiqúe *et al.*, 2004). Por tanto, no es de extrañar que la determinación de la secuencia del ARNr 16S presente importantes limitaciones a la hora de identificar con precisión un aislado clínico perteneciente al grupo de los SMG (Clarridge, 2004; Haanperä *et al.*, 2007). Por otro lado, los métodos bioquímicos tampoco son de gran utilidad en este grupo de microorganismos y ni siquiera técnicas tan precisas como el MALDI-TOFF (La Scola, 2011; Wieser *et al.*, 2012) parecen ser capaces de identificar correctamente los SMG (López Roa *et al.*, 2013), a pesar de los notables avances producidos en este campo (Werno *et al.*, 2012; Dubois *et al.*, 2013). Hasta el momento, las técnicas que han proporcionado mejores resultados (pero todavía incompletos) en la identificación de SMG, han sido la secuenciación parcial de los genes *sodA* (que codifica una superóxido dismutasa dependiente de manganeso) (Poyart *et al.*, 1998; Kawamura *et al.*, 1999) y *recN* (Glazunova *et al.*, 2010). De manera independiente, el análisis mediante secuenciación multilócica (MLSA) (Hanage *et al.*, 2006a) está concebido para identificar especies de estreptococos α -hemolíticos estrechamente relacionados con *S. pneumoniae* y que son difíciles de diferenciar por otros métodos (Bishop *et al.*, 2009) (<http://www.emlsa.net/>). Por otra parte, aunque la hibridación ADN-ADN continúa siendo utilizada en laboratorios especializados para la discriminación de especies entre los SMG (Stackebrandt y Goebel, 1994), esta técnica no se puede implementar rutinariamente en la práctica hospitalaria.

Aunque las razones que subyacen al problema de la identificación no están del todo claras, parece razonable suponer que los fenómenos de transferencia horizon-

tal de material genético han debilitado notablemente —cuando no suprimido— las barreras específicas. Esta explicación, entre otras, se encuentra en realidad en las discusiones actuales sobre el concepto de especie en bacterias (Schleifer, 2009; Mira *et al.*, 2010; Vos, 2011; Kämpfer, 2012; Tang y Liu, 2012). En el caso de los estreptococos α -hemolíticos y más concretamente en los SMG, se ha comprobado la existencia de numerosos fenómenos de recombinación genética (Berg *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012). Los SMG son bacterias comensales y/o patógenos oportunistas de la cavidad oral y el tracto respiratorio y, recientemente, se ha observado que, en colaboración con otras bacterias con las que comparten hábitat, podrían estar desempeñando un papel importante en la patogenia de un buen número de enfermedades (Whitmore y Lamont, 2011). La mayoría de los miembros de los SMG son competentes de manera natural para transformación genética produciendo feromonas de competencia (producto del gen *comC*) y receptores para las mismas (el sistema de dos componentes ComD-ComE) (Håvarstein, 2010). En consecuencia, se cree que la recombinación homóloga juega un papel fundamental en la evolución de estas bacterias difuminando las barreras genéticas (Hanage *et al.*, 2006b) y que tiene un reflejo bien conocido en la existencia de diversos genes con estructura en mosaico (Dowson *et al.*, 1989; Mollerach y García, 2000; Hakenbeck *et al.*, 2001; King *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2007; Hanage *et al.*, 2009; Balsalobre *et al.*, 2013). En la mayoría de los eventos de transferencia horizontal de material genético en los que participa neumococo, están implicadas especies estrechamente relacionadas con él (*S. mitis*, *S. oralis* o *S. infantis*) y que comparten su mismo nicho ecológico; concretamente, se ha descrito a *S. mitis* como el principal reservorio de variabilidad genética de *S. pneumoniae* (Donati *et al.*, 2010).

S. pneumoniae (neumococo) es un patógeno humano de la máxima relevancia clínica que está estrechamente relacionado con otros SMG comensales del tracto respiratorio superior y de la cavidad oral como *S. mitis*, *S. oralis* o *S. infantis*, que raramente causan enfermedad (Maeda *et al.*, 2010, 2011; Mitchell, 2011). Actualmente, las razones que explican la gran diferencia existente entre el potencial patológico de neumococo y los otros SGM son conocidas sólo parcialmente. Se han descrito numerosos factores de virulencia de neumococo, la mayoría de cuales se han encontrado también en *S. mitis* o *S. oralis* (Hakenbeck *et al.*, 2009; Denapáite *et al.*, 2010; Madhour *et al.*, 2011). Incluso, se ha demostrado que algunas cepas de *S. mitis* son capaces de sintetizar cápsulas polisacáridicas al igual que neumococo (Rukke *et al.*, 2012), pero éste no parece ser el caso de las cepas conocidas de *S.*

pseudopneumoniae (Shahinas *et al.*, 2013) o *S. oralis* (Kilian *et al.*, 2008; Reichmann *et al.*, 2011). En cualquier caso, hay que resaltar el hecho de que, desde el punto de vista de la virulencia, neumococo representa, con mucho, el principal patógeno en el grupo de los SMG.

Tabla 1. Estreptococos del Grupo Mitis (SMG)^a

Nombre	Referencia
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(Chester, 1901)
<i>Streptococcus mitis</i>	(Andrewes y Horder, 1906)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	(White y Niven, 1946)
<i>Streptococcus oralis</i>	(Bridge y Sneath, 1982)
<i>Streptococcus gordonii</i>	(Kilian <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	(Whiley <i>et al.</i> , 1990)
<i>Streptococcus cristatus</i>	(Handley <i>et al.</i> , 1991)
<i>Streptococcus infantis</i>	(Kawamura <i>et al.</i> , 1998)
<i>Streptococcus peroris</i>	(Kawamura <i>et al.</i> , 1998)
<i>Streptococcus australis</i>	(Willcox <i>et al.</i> , 2001)
<i>Streptococcus sinensis</i>	(Woo <i>et al.</i> , 2002)
<i>Streptococcus oligofermentans</i>	(Tong <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	(Arbique <i>et al.</i> , 2004)
<i>Streptococcus lactarius</i>	(Martín <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptococcus tigurinus</i>	(Zbinden <i>et al.</i> , 2012)
<i>Streptococcus troglodytidis</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
<i>Streptococcus rubneri</i>	(Huch <i>et al.</i> , 2013)
<i>Streptococcus dentisani</i>	(Camelo-Castillo <i>et al.</i> , 2013)

^a *Streptococcus massiliensis* también podría formar parte de los SMG aunque su situación filogenética no es del todo clara (Glazunova *et al.*, 2006).

2. *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

2.1. *Características generales*

Como otros estreptococos, *S. pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, de entre 0.5 y 1.25 μm , inmóvil y que forma, generalmente, cadenas cortas o diplococos. Como ya se ha comentado, se encuentra frecuentemente formando parte de la microbiota del tracto respiratorio superior humano. Cuando se cultiva en placas de agar-sangre, en aerobiosis, muestra α -hemólisis (Cole, 1914) típica de los estreptococos viridans mientras que, en condiciones anaerobias, presenta β -hemólisis debido a la acción de la neumolisina (Ply) (Brzin, 1969). De manera característica, neumococo se lisa rápidamente en presencia de sales biliares como el desoxicolato sódico (Doc) (Neufeld, 1900; Avery y Cullen, 1923), el cual dispara la acción incontrolada de la principal autolisina de neumococo, LytA (Mosser y Tomasz, 1970; Höltje y Tomasz, 1975b; García *et al.*, 1985). *S. pneumoniae* es una bacteria auxótrofa para la colina (Rane y Subbarow, 1940a, b) siendo este aminoalcohol, en forma de fosforilcolina, un componente estructural de los ácidos teicoicos (TA) y lipoteicoicos (LTA) de su pared celular (Tomasz, 1967; Brundish y Baddiley, 1968; Briles y Tomasz, 1973; Gisch *et al.*, 2013).

Las pruebas diagnósticas para la identificación de neumococo que se utilizan en los laboratorios clínicos son, además de la lisis (“solubilidad”) en presencia de Doc, la susceptibilidad a la optoquina (Opt) —etilhidrocupreína; un derivado de la quinina— (Morgenroth y Levi, 1911a, b) y la reacción capsular en presencia de anticuerpos o reacción de Quellung (Neufeld, 1902). Aunque neumococo es generalmente susceptible a la Opt, existen cepas Opt-resistentes de *S. pneumoniae* mientras que algunos SMG pueden ser susceptibles a dicho compuesto (Fenoll *et al.*, 1994; de la Campa *et al.*, 1997; Martín-Galiano *et al.*, 2003; Balsalobre *et al.*, 2006). Es por esto por lo que la identificación es más fiable si las pruebas antes mencionadas se realizan conjuntamente (Lund y Henrichsen, 1978).

El genoma de neumococo tiene una longitud media de 2.1 millones de pares de bases (Mpb) con un contenido en G+C de $\approx 40\%$ (Donati *et al.*, 2010).

2.2. Importancia clínica y prevención de la infección neumocócica

El neumococo fue descrito por primera vez en 1881 por Louis Pasteur y George M. Sternberg quienes, de forma independiente y casi simultánea, aislaron un microorganismo presente en la saliva humana y que era capaz de causar enfermedad sistémica en conejos (Pasteur, 1881; Pasteur *et al.*, 1881; Sternberg, 1881). En 1884, Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre, no tanto para diferenciar unas bacterias de otras como para facilitar la visualización de neumococo en el tejido pulmonar (Gram, 1884). Ese mismo año, este microorganismo fue denominado *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884), más tarde *Diplococcus pneumoniae* (Weichselbaum, 1886) y, finalmente, "*Streptococcus pneumoniae*" (Chester, 1901). Esta designación fue finalmente aprobada en 1980 (Skerman *et al.*, 1980).

S. pneumoniae ha desempeñado un papel fundamental en la bioquímica, la genética e, incluso, el nacimiento de la biología molecular. En 1928, Griffith obtuvo la primera evidencia de transformación genética bacteriana trabajando con *S. pneumoniae* (Griffith, 1928). Este investigador demostró que una infección mixta de ratones utilizando neumococos capsulados muertos por calentamiento y neumococos no capsulados (avirulentos pero vivos), resultaba en la muerte de algunos animales. Las bacterias que se recuperaban de éstos eran del tipo capsulado. A la sustancia responsable de este cambio se le denominó "principio transformante". Este "principio" fue identificado a nivel molecular por Oswald T. Avery y sus colaboradores del Instituto Rockefeller de Nueva York, en una serie de estudios llevados a cabo en los años 30 y que culminaron en 1944 con la propuesta de que la molécula responsable de la transformación, esto es, de la herencia genética, era el ADN (Avery *et al.*, 1944; McCarty y Avery, 1946).

S. pneumoniae es, de manera natural y con pocas excepciones, un patógeno exclusivamente humano (Benson y Sweeney, 1984; Timoney, 2004; Wood *et al.*, 2005; Laus *et al.*, 2009; van der Linden *et al.*, 2009; Denapate y Hakenbeck, 2011) con una gran capacidad para causar enfermedad. El hábitat natural de neumococo es el tracto respiratorio superior humano y, debido posiblemente a su conocida capacidad de formación de biofilmes (Domenech *et al.*, 2012), ya desde poco después de su primer aislamiento se observó que *S. pneumoniae* es portado de manera asintomática en la nasofaringe (estado de portador) de un gran número de niños (20–40%) aunque es menos frecuente (5–10%) en adultos (Dochez y Avery, 1915). La colonización del tracto respiratorio superior tiene lugar a los pocos días del na-

cimiento (Austrian, 1986; Weiser, 2010). Una vez establecido el estado de portador, neumococo puede diseminarse, colonizar e invadir, principalmente, el oído medio (produciendo otitis media), los pulmones (neumonía), el sistema nervioso central (meningitis) o el torrente sanguíneo (septicemia). No obstante, la aparición de síntomas clínicos viene determinada por ciertos factores de interacción entre el hospedador y la bacteria, como es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010). Así, los neumococos de serotipos 3, 6B o 19F son los más virulentos en adultos mientras que los de serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F son los que, con más frecuencia, causan enfermedad invasiva en niños (Henriques *et al.*, 2000). Además de la edad (mayor incidencia de enfermedad en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años), otros factores que influyen en la aparición de síntomas de infección neumocócica son el estado inmunológico (las personas inmunodeprimidas son más propensas), la infección previa del sistema respiratorio por otros agentes patógenos como el virus de la gripe (McCullers, 2006; Wang *et al.*, 2011) o factores genéticos del hospedador no bien definidos todavía (Brouwer *et al.*, 2009; Sanders *et al.*, 2011).

Las enfermedades respiratorias son las responsables de la muerte anualmente de 4 millones de personas, siendo *S. pneumoniae* la especie predominante (Morens *et al.*, 2004). De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, la sepsis, la neumonía neonatal y la neumonía comunitaria en niños mayores dan cuenta de casi el 30% de los 10.6 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años, siendo *S. pneumoniae* el causante más frecuente de neumonía infantil severa, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Concretamente, en Asia y África, la neumonía constituye la principal causa de mortalidad infantil (UNICEF y WHO, 2006). Además, cada año se producen casi 15 millones de casos graves de enfermedad neumocócica en la población infantil (O'Brien *et al.*, 2009). Por otra parte, las estimaciones de los costes, directos e indirectos, consecuencia de las infecciones neumocócicas en personas de edad avanzada indican que éstos pueden superar los 5 000 millones de dólares anuales sólo en EE. UU. (Weycker *et al.*, 2010).

Desde que fueron descritos los primeros casos de neumococos resistentes a penicilina en la década de los sesenta del pasado siglo (Kislak *et al.*, 1965; Hansman y Bullen, 1967), la aparición en muchos países, incluido el nuestro, de cepas resistentes y multirresistentes promovió la búsqueda urgente de una vacuna eficaz frente a este microorganismo. El desarrollo de estas vacunas se basó en el

hecho bien contrastado de que los anticuerpos frente a un serotipo capsular (véase más adelante la serotipificación de *S. pneumoniae*) protegían de una infección posterior causada por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentasen alguna reacción cruzada con aquél (Lyall y Odell, 1939; Welch *et al.*, 1939; Heidelberger, 1983). Considerando que algunos serotipos tienen una mayor incidencia que el resto, durante el desarrollo de vacunas compuestas por combinación de polisacáridos capsulares (CPSs) se han considerado los más frecuentes. La vacuna 23-valente (PPSV23), compuesta por una mezcla de los 23 CPSs de los serotipos responsables de la mayoría de las infecciones neumocócicas (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F) está actualmente recomendada para adultos ≥ 65 años o menores de esta edad con, entre otras afecciones, enfermedades pulmonares o cardiovasculares crónicas así como para niños de más de 2 años con patologías que aumenten el riesgo de desarrollar infecciones neumocócicas (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Los CPSs estimulan la actividad de las células B, por lo que inducen una respuesta inmune independiente de linfocitos T (es decir, no generan memoria inmunológica). Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad de los polisacáridos, se desarrolló en 2001, la vacuna conjugada 7-valente (PCV7), en la que los CPSs de los serotipos responsables de la mayoría de los casos de enfermedad neumocócica invasiva infantil en EE. UU. (4, 6B, 19F, 23F, 18C, 14 y 9V), se conjugaron a un componente proteico (toxóide diftérico) capaz de estimular la respuesta mediada por linfocitos T por lo que sí genera memoria inmunológica (American Academy of Pediatrics, 2000). En la actualidad, se está administrando, tanto a la población infantil como a la adulta, la vacuna conjugada 13-valente (PCV13) que adicionalmente incluye CPSs de los serotipos 1, 3, 5, 6A, 6B, 7F y 19A (Paradiso, 2011, 2012). Los aspectos negativos de las vacunas conjugadas son el limitado número de serotipos frente a los que protege, el alto coste de cada dosis y el fenómeno de “reemplazo de serotipo”, no presentes en la vacuna, que causan enfermedad y que se está produciendo como consecuencia de la introducción de estas vacunas conjugadas (Weinberger *et al.*, 2011).

Como resultado de los problemas planteados por vacunas basadas en antígenos polisacáridicos, numerosos grupos de investigación de todo el mundo trabajan en la búsqueda de una vacuna basada en proteínas de la bacteria que sean comunes a todos o a la mayoría de aislados clínicos, que posean un alto grado de conservación y que confieran inmunidad. Diferentes proteínas antigénicas de neumococo

han sido descritas como posibles candidatas a formar parte de una vacuna de naturaleza proteica siendo Ply, PspC, PspA, PsaA, y NanA, las más prometedoras (Lebon *et al.*, 2011; Prevaes *et al.*, 2012). Sin embargo, al menos hasta ahora, ninguna de ellas ha sido considerada como un candidato adecuado para proporcionar protección suficiente cuando se utiliza de forma individualizada. Una posible explicación podría deberse al marcado polimorfismo de algunas de estas proteínas (Briles *et al.*, 1998). En cualquier caso, la combinación de proteínas se considera que es el futuro en el desarrollo de las nuevas estrategias vacunales ya que existen datos que demuestran que ciertas combinaciones de proteínas proporcionan un efectivo aditivo, o incluso sinérgico, en términos de inmunoprotección (Tai, 2006; Oggunniyi *et al.*, 2007; Lebon *et al.*, 2011).

2.3. Técnicas de tipificación

En la actualidad, los estudios epidemiológicos sobre *S. pneumoniae* despiertan un gran interés debido a su gran incidencia como patógeno, la aparición de cepas multirresistentes y la necesidad del estudio de la eficacia de las vacunas antineumocócicas. Para realizar estos estudios, se han ido desarrollado numerosas técnicas fenotípicas y genotípicas (Harrison *et al.*, 2011). La tipificación convencional de neumococo corresponde a la determinación del tipo capsular (serotipo) utilizando sueros específicos obtenidos en conejos. Esta técnica fue descrita ya en 1902 por Neufeld y consiste en la visualización de la cápsula aparentemente “hinchada” como consecuencia de la precipitación de los polisacáridos que componen la cápsula en presencia de anticuerpos específicos (Neufeld, 1902). Aunque en uso todavía en muchos laboratorios con personal especializado, se han desarrollado tecnologías alternativas basadas en la reacción de la cápsula con anticuerpos específicos que permiten simplificar el procedimiento clásico (Fenoll *et al.*, 1997; Marimon *et al.*, 2010). Aunque la cápsula de neumococo (CPS) es el principal factor de virulencia del microorganismo, no parece poseer un papel determinante en la adhesión, invasión o inflamación en el hospedador sino que confiere una importante capacidad de evasión fagocítica (Hyams *et al.*, 2010). La cápsula, aunque prescindible para la viabilidad de la bacteria en condiciones de laboratorio, es, sin embargo, un requisito fundamental para su patogenicidad (Griffith, 1928). No obstante, se han encontrado cepas de neumococo no tipificables (previsiblemente carentes de CPS), genéticamente diversas (Park *et al.*, 2012), que causan conjuntivitis en forma de frecuentes

brotes (Porat *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007) o casos aislados (Haas *et al.*, 2011; Marimon *et al.*, 2013) así como otitis media (Xu *et al.*, 2011).

La cápsula de neumococo está formada por polisacáridos complejos que, a su vez, están compuestos por unidades repetidas de azúcares (Kamerling, 2000). Estos polisacáridos están unidos al peptidoglicano, o a componentes de la membrana, que en algunos casos pueden liberarse de la célula (Yother, 2011; Eberhardt *et al.*, 2012). En la actualidad, se han descrito 95 serotipos capsulares inmunológicamente diferentes, 90 de los cuales fueron ya descritos hasta 1995 (Henrichsen, 1995), mientras que los cinco serotipos adicionales han sido identificados en los últimos años como consecuencia del desarrollo de métodos analíticos más sensibles (Calix *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2013a, b). Los 95 serotipos capsulares actuales se agrupan en 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (los números 26 y 30 no se utilizan). Algunos serogrupos como el 1, 2 y 3, incluyen un único serotipo mientras que otros, como el serogrupo 11, pueden contener hasta 6. Normalmente, el primer serotipo descrito en un serogrupo con varios serotipos se identifica con la letra F (por *First*) y los siguientes con las letras A, B, etc. Existen, no obstante, tres excepciones: el serogrupo 6, que incluye los serotipos 6A, 6B, 6C, y 6D; el 20, con los serotipos 20A y 20B; y el serogrupo 9, en el que las letras de los tres primeros serotipos descritos (Vammen, 1939) tienen relación con personajes históricos (L por Lederle, N por Neufeld y V por Valdemar, un príncipe danés muerto en 1938 de una neumonía bacteriémica y del que se aisló el primer neumococo de este serotipo) (Henrichsen, 1995). Los genes implicados en la producción de la cápsula están localizados en un mismo locus denominado, según diferentes autores, *cap* o *cps* y típicamente codifican una “flipasa” (enzima encargada de transportar el polisacárido naciente a la cara externa de la membrana celular), una polimerasa y varias transferasas que catalizan la formación de enlaces, adición de azúcares y modificación de unidades repetidas. Una de las características más llamativas del locus *cap* es su enorme divergencia genética, puesto que sólo unos pocos genes se encuentran conservados entre los diferentes clusters (Bentley *et al.*, 2006). Los primeros cuatro genes del locus, referidos como *capA-D/cpsA-D* (o *wzg*, *wzh*, *wzd* y *wze*) (Reeves *et al.*, 1996), están altamente conservados en todos los serotipos —excepto en los serotipos 3 y 37— y han sido implicados, entre otras funciones, en la regulación de la biosíntesis del CPS (Llull *et al.*, 2001; López y García, 2004; Moscoso y García, 2009; Yother, 2011). Todos estos datos han permitido el desarrollo de diversos pro-

cedimientos de serotipificación utilizando técnicas moleculares (Kong *et al.*, 2005; Tarragó *et al.*, 2008; Tomita *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2012).

La determinación de las resistencias antimicrobianas, la tipificación de la proteína A de superficie (PspA) y la electroforesis de ADN genómico en campo pulsado (PFGE) (Gasc *et al.*, 1991; Lefevre *et al.*, 1993) también se utilizan hoy en día como instrumentos de tipificación de neumococo. Aunque, hasta 1998, año en el que se propuso la tipificación mediante secuenciación multilócica o MLST (Enright y Spratt, 1998a), la técnica más utilizada seguía siendo la serotipificación. La técnica de MLST se basa en los mismos principios que la electroforesis multienzimática (*Multi-locus enzyme electrophoresis*) (Selander *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1996), pero se diferencia de ésta esencialmente en que lo que se comparan son las secuencias parciales de siete genes muy conservados (*housekeeping*) en lugar de la movilidad electroforética de diversas enzimas. Esto hace que la comparación entre los resultados obtenidos en diferentes laboratorios sea muy sencilla y, para ello, se ha creado una base de datos (BD) en Internet (<http://spneumoniae.mlst.net/>) (Enright y Spratt, 1999a). Los alelos secuenciados a partir de una parte de los genes *aroE* (siquimato deshidrogenasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gki* (glucoquinasa), *recP* (transcetolasa), *spi* (peptidasa señal I), *xpt* (xantina fosforribosiltransferasa) y *ddl* (D-alanina-D-alanina ligasa) reciben un número al ser introducidos en la BD y el conjunto de dichos números se denomina *secuencitipo* (ST; *sequence type*). Un total de 9138 STs se encuentran incluidos en la BD (último acceso, 18 de octubre de 2013). Todos los aislados de neumococo que poseen el mismo ST se dice que constituyen un clon. Inicialmente, los diferentes miembros del clon son, evidentemente, indistinguibles por MLST pero, con el tiempo, dicho clon puede diversificarse dando lugar a variantes que difieran en uno de los siete *loci* (SLV, *single locus variants*) o más. El conjunto de ST idénticos y los que difieren entre sí con al menos un miembro del grupo en sólo uno de los siete genes recibe el nombre de complejo clonal (CC) (Aanensen y Spratt, 2005). Mención especial merece el caso del gen *ddl*. Éste se encuentra situado cerca del gen *pbp2b* que codifica la proteína de unión a penicilina (PBP) 2b. Con gran frecuencia, los aislados de neumococo penicilín-resistentes poseen un alelo *ddl* con un alto grado de divergencia puesto que el fragmento de ADN que porta el gen *pbp2b* (que es importado de otros SMG) también puede contener el gen *ddl* o parte de él. Este alto grado de divergencia filogenética del gen *ddl* (Enright y Spratt, 1999b) puede dificultar la identificación precisa

de neumococo en muestras clínicas por lo que, con frecuencia, es omitido del análisis (Hanage *et al.*, 2005).

Hay que destacar, sin embargo, que las técnicas actuales de tipificación de *S. pneumoniae* presentan una serie de limitaciones. Hasta hace no mucho tiempo, estaba comúnmente aceptado que dos cepas con el mismo serotipo eran clones, es decir, que descendían de un ancestro común reciente pero, actualmente, se sabe que esto no es cierto debido a que dos cepas que presentan el mismo serotipo se pueden comportar de manera muy diferente. Además, los eventos de transformación capsular que se han descrito (Brueggemann *et al.*, 2007; Temime *et al.*, 2008; Pillai *et al.*, 2009; Wyres *et al.*, 2013) —sobre todo desde la aplicación masiva de las vacunas conjugadas—, hacen que la serotipificación, aunque adecuada para el estudio de la eficacia de las vacunas, no sea una técnica aconsejable, en general, para la tipificación de neumococo o, al menos, para su utilización exclusiva. Por otro lado, la técnica de PFGE es reproducible y posee un buen poder de resolución, pero es laboriosa, consume mucho tiempo, el personal técnico que la realice debe estar bien entrenado para evitar resultados ambiguos y los resultados que proporciona no siempre son fáciles de comparar entre distintos laboratorios. Finalmente, como ya se ha mencionado, MLST es la técnica más utilizada actualmente para la tipificación de neumococo y tiene las ventajas de ser una técnica fácil, reproducible, nada ambigua y que permite una fácil comparación. No obstante, se trata de una técnica costosa para ser implementada de manera rutinaria en los laboratorios clínicos y, además, presenta una gran limitación y es que, al igual que ocurrió anteriormente con la serotipificación, se ha supuesto que dos cepas con el mismo ST eran clones; sin embargo, ya ha quedado demostrado que dos cepas con el mismo ST no se comportan de igual manera y, por otro lado, dos cepas que comparten el mismo ST, pueden tener diferente serotipo (Silva *et al.*, 2006; Hiller *et al.*, 2010; Croucher *et al.*, 2011). Adicionalmente, aislados clínicos con el mismo MLST presentan distintas regiones genómicas accesorias (sólo detectables por secuenciación genómica completa), lo que tiene un impacto crucial en su capacidad invasiva (Donkor *et al.*, 2012). Toda esta problemática que se plantea alrededor de estas técnicas, hace necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales para una correcta tipificación de *S. pneumoniae*.

Al menos en principio, cabría la posibilidad de desarrollar un nuevo sistema de tipificación neumocócica que combinara una parte de la sensibilidad y reproducibilidad de la MLST con una reducción en el número de genes a secuenciar para redu-

cir costes y poder aplicar el sistema a un número elevado de muestras. Todo ello podría, eventualmente, facilitar su utilización en la práctica clínica. Con este fin habría que establecer, en primer lugar, las condiciones que deberían reunir, idealmente, tales genes. Entre otras consideraciones (Enright y Spratt, 1998), los genes deberían ser lo más específicos posible, es decir, encontrarse solamente en todos los aislados de la especie en cuestión (o de un número reducido de especies próximas) o, en su defecto, poseer características distintivas. Para reducir los costes y manipulaciones en el hospital, sería conveniente que el gen en cuestión poseyera un tamaño tal que pudiera ser secuenciado, al menos, en su mayor parte con sólo un par de cebadores. Además, sería ventajoso que dicho gen poseyera un polimorfismo relativamente elevado (aunque neutro desde el punto de vista evolutivo y/o funcional) entre distintos aislados clínicos (Enright y Spratt, 1998). En este sentido sería positivo que dicho polimorfismo fuera debido a mutaciones puntuales (transiciones y transversiones) más que a delecciones/inserciones para permitir un análisis filogenético más ajustado de las secuencias obtenidas.

En neumococo, es bien conocido el hecho de que la recombinación, generada por procesos de transferencia genética horizontal, da lugar a nuevos alelos y cambios de nucleótido (nt) con una frecuencia 10 y 50 veces más elevada que la mutación, respectivamente (Feil *et al.*, 2000). Además, en un estudio llevado a cabo con genomas de 240 aislados del clon Spain^{23F}-1, se pudo comprobar que, con la notable excepción de la inserción/delección de un transposón tipo Tn5252 (ICE; *integrative and conjugative element*) —que codifica resistencias a cloranfenicol y tetraciclina— y de diversos profagos, la mayoría de los polimorfismos detectados se encontraban en genes que codificaban proteínas de superficie con conocida capacidad antigénica, principalmente *pspA*, *pspC*, *psrP* y el locus capsular (Croucher *et al.*, 2011). Resulta, además, destacable el hecho de que tanto *pspA* como *psrP* mostraron una marcada tendencia tanto a sufrir inserciones/delecciones de pequeño tamaño —con la consiguiente conversión en pseudogenes (*pspA*)— como a sufrir delecciones de la isla genómica que contiene a *psrP*. PspP es una proteína de ≈ 4500 aminoácidos (aa), rica en residuos de serina y, muy posiblemente, altamente glicosilada que se encuentra sólo en algunos aislados de neumococo (Obert *et al.*, 2006). Por su parte, PspA y PspC son miembros de una familia de proteínas característica, aunque no exclusiva, de *S. pneumoniae* conocida como proteínas de unión a colina o CBPs, descritas en el siguiente apartado.

2.4. Proteínas de unión a colina

Los residuos de fosforilcolina que forman parte de los TA y LTA de la pared celular de neumococo desempeñan un papel fundamental en las interacciones entre la célula hospedadora y el patógeno. Por ejemplo, la proteína C reactiva (proteína de fase aguda cuya concentración se incrementa rápidamente en respuesta a infecciones o daños) interacciona con la fosforilcolina, lo que permite la activación del complemento y la protección contra infecciones neumocócicas (Volanakis y Kaplan, 1971) y los LTA están también implicados en la iniciación de las cascadas inflamatorias por la activación de la vía del complemento (Weidenmaier y Peschel, 2008; Ho *et al.*, 2008). Además, los TA funcionan como receptores para ciertos bacteriófagos (Lopez *et al.*, 1982). En la actualidad, existen numerosos trabajos que describen la presencia de colina en los TA de otros estreptococos comensales [véase García *et al.* (2000), para una revisión]. Además, Kilian *et al.* (2008), utilizando dos anticuerpos monoclonales (que reconocen epítomos característicos de la estructura del polisacárido C o sólo residuos de fosforilcolina), detectaron la presencia de colina en todas las cepas analizadas de *S. pseudopneumoniae* y *S. oralis*; también detectaron colina en la mayoría de las cepas de *S. mitis* (las que no presentaban colina presentaban el aminoalcohol etanolamina) y las cepas de *S. infantis* mostraban una presencia variable de los dos epítomos. La secuenciación de numerosos genomas bacterianos en los últimos años ha puesto de manifiesto la posible existencia de colina en un número significativo de bacterias Gram-positivas sobre la base de la existencia de proteínas similares a las CBPs de neumococo y otros SMG (García *et al.*, 2000) (Tabla 2).

Los residuos de fosforilcolina de los TA constituyen los ligandos de las CBPs, proteínas de la superficie celular que desempeñan un papel fundamental en la fisiología de la pared celular así como en la interacción de la bacteria y el hospedador. Por lo tanto, no es de extrañar que se hayan identificado ciertas CBPs en los estreptococos que presentan colina en su pared. Madhour *et al.* (2011), utilizando hibridación ADN-ADN, observaron que las cepas de *S. mitis* presentan, al menos, 22 CBPs mientras que las cepas de *S. oralis* parecen codificar 10. Se ha visto, por ejemplo, que *S. mitis* B6 contiene un gran número de CBPs que no se encuentran en *S. pneumoniae* R6 o TIGR4 (Hakenbeck *et al.*, 2009; Denapaite *et al.*, 2010) mientras que otras CBPs (CbpD, CbpF y LytB), están presentes en muchas cepas de *S. mitis* y *S. oralis* (Moscoso *et al.*, 2005; Madhour *et al.*, 2011) al igual que en *S.*

pneumoniae. En la Tabla 3 están indicadas todas las CBPs que se han identificado en las cepas R6 (o D39) (Hoskins *et al.*, 2001; Lanie *et al.*, 2007) y TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) de *S. pneumoniae*. Con la excepción de CbpF (formada exclusivamente por repeticiones de motivos de unión a colina) (Molina *et al.*, 2009), todas las CBPs tienen la característica común de ser proteínas modulares compuestas por, al menos, 2 dominios diferentes: uno de reconocimiento de colina, denominado dominio de unión a colina (CBD, *Choline Binding Domain*) —que le permite a la proteína unirse de forma no covalente a los residuos de colina de la superficie bacteriana— y otro funcional, responsable de la actividad biológica de cada proteína, sea ésta enzimática o no (García *et al.*, 2000; López y García, 2004; López *et al.*, 2004; Swiatlo *et al.*, 2004). Los CBDs se caracterizan por poseer un número variable, pero siempre ≥ 4 (García *et al.*, 1994), de repeticiones de unos 20 aa cada una, que se denominan CBRs (repeticiones de unión a colina, *Choline Binding Repeats*) (García *et al.*, 1988).

Tabla 2. Especies bacterianas diferentes a neumococo que, posiblemente, codifican diversas CBPs^a

Especie	Número de acceso/Referencias ^a
<u>Actinomycetales (Actinomycetaceae)</u>	
<i>Actinomyces odontolyticus</i> F0309	ACYT00000000
<i>Actinomyces urogenitalis</i> DSM 15434	ACFH01000000
<u>Coriobacteriales (Coriobacteriaceae)</u>	
<i>Cryptobacterium curtum</i> DSM 15641	NC_013170
<i>Eggerthella</i> sp. 1_3_56FAA	NZ_ACWN01000000
<i>Slackia exigua</i> ATCC 700122	ACUX00000000
<i>Slackia heliotrinireducens</i> DSM 20476	ABUP01000000
<u>Bacillales</u>	
<u>Bacillaceae</u>	
<i>Bacillus cereus</i> Rock1-3	ACMG01000000
<i>Bacillus mycoides</i> Rock3-17	ACMW01000000
<i>Bacillus pseudomycoides</i> DSM 12442	ACMX01000000
<u>Incertae sedis</u>	
<i>Gemella haemolysans</i> ATCC 10379	ACDZ00000000
<i>Gemella morbillorum</i> M424	ACRX00000000
<u>Clostridiales</u>	
<u>Lachnospiraceae</u>	
<i>Blautia hansenii</i> DSM 20583	ABYU00000000

INTRODUCCIÓN

<i>Dorea formicigenerans</i> ATCC 27755	AAXA01000000
<i>Dorea longicatena</i> DSM 13814	NZ_AAXB02000000
<i>Lachnoanaerobaculum saburreum</i> DSM 3986 (<i>Eubacterium saburreum</i> DSM 3986)	AEPW01000000
<i>Johnsonella ignava</i> ATCC 51276	NZ_ACZL01000000
<i>Lachnospiraceae</i> bacterium 6_1_63FAA	NZ_ACTV01000000
<i>Oribacterium</i> sp. oral taxon 078 str.	NZ_AWVU01000000
<i>Ruminococcus torques</i> L2-14	NC_021015
Clostridiaceae	
<i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	NC_009617/Podvin <i>et al.</i> , 1988; Sanchez-Beato <i>et al.</i> , 1995; Sánchez-Beato y García, 1996
<i>Clostridium boltea</i> ATCC BAA-613	NZ_ABCC02000000
<i>Clostridium botulinum</i> B str. Eklund 17B	NC_010674
<i>Clostridium citroniae</i> WAL-17108	NZ_ADJL01000000
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 43255	NZ_CM000604/Demarest <i>et al.</i> , 2005; Ho <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium hathewayi</i> WAL-18680	NZ_ADLN01000000
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	NC_008261
<i>Clostridium saccharolyticum</i> WM1	NC_014376
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	NZ_AOIF00000000/del Cerro <i>et al.</i> , 2013
Eubacteriaceae	
<i>Eubacterium rectale</i> ATCC 33656	NC_012781
<u>Erysipelotrichales (Erysipelotrichaceae)</u>	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> str. Fujisawa	NC_01560/Makino <i>et al.</i> , 1998, 2000; Ogawa <i>et al.</i> , 2011
<i>Solobacterium moorei</i> F0204	AECQ00000000
<u>Lactobacillales</u>	
<u>Carnobacteriaceae</u>	
<i>Granulicatella elegans</i> ATCC 700633	NZ_ACRF02000000
<u>Lactobacillaceae</u>	
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	ACGI01000000
<u>Streptococcaceae</u>	
<i>Streptococcus infantis</i> ATCC 700779	AJTA01000000
<i>Streptococcus mitis</i> B6	NC_013853/Denapaité <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptococcus oralis</i> Uo5	NC_015291/Reichmann <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> IS7493	NC_015875/Shahinas <i>et al.</i> , 2011, 2013

^a Las referencias muestran evidencias de la existencia de TA conteniendo colina y/o CBPs.

Tabla 3. Proteínas de unión a colina (CBPs) identificadas en las cepas TIGR4, D39 y R6 de *S. pneumoniae*

locus	TIGR4		D39		R6		Referencia
	Producto (aa)	locus	Producto (aa)	locus/gen	Producto (aa)	Possible función	
SP0069	CbpI (211)	--	--	--	--	Unión a elastina y CRP	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP0117	PspA (744)	SPD_0126	PspA (619)	spr0121/pspA	PspA (619)	Unión a lactoferrina	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1999)
SP0377	CbpC (340)	SPD_0345	CbpF (338)	spr0337/cbpF	CbpF (338)	Unión a elastina y plasmínogeno Inhibición de LyfC	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001; Molina <i>et al.</i> , 2009; Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP0378	CbpJ (332)	--	--	--	--	Unión a CRP	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP0390	CbpG (285)	SPD_0356	CbpG (154)	spr0349/cbpG truncada spr0350/cbpG	CbpG truncada (218) CbpG (42)	Serín-proteasa	(Gosink <i>et al.</i> , 2000; Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001)
SP0391	CbpF ^a (340)	SPD_0357	CbpF (294)	spr0351/pspC	PcpC (294)	ND	Z82002 ^a
SP0667	CbpL (332)	SPD_0579	- (329)	spr0583/-	CbpL (329)	Murein hidrolasa Unión a elastina, colágeno y CRP	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Hoskins <i>et al.</i> , 2001; Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP0930	CbpE (627)	SPD_0821	CbpE (627)	spr0831/lyfD	CbpE ^c (627)	Liberación de colina de la pared celular Unión al plasmínogeno, enolasa, GADPH, laminina y factor H	(de las Rivas <i>et al.</i> , 2001; Hölte y Tomasz, 1974; Bergmann <i>et al.</i> , 2001; Bergmann <i>et al.</i> , 2004; Altall <i>et al.</i> , 2008a; Altall <i>et al.</i> , 2008b; Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP0965	Glucosaminidasa (658)	SPD_0853	LyfB (702)	spr0867/lyfB	LyfB (678)	Separación células hijas	(de las Rivas <i>et al.</i> , 2002; García <i>et al.</i> , 1999b)
SP1417	CbpM	SPD_1248	- (129)	spr1274/pspA truncada	CbpM (129)	Unión a CRP	(Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP1573	*	SPD_1403	LyfC (491)	spr1431/lyfC	LyfC (491)	Autólisis a 30°C Implicada en el fraticidio	(García <i>et al.</i> , 1999a; Pérez-Dorado <i>et al.</i> , 2010)
SP1937	Autolisina (318)	SPD_1737	LyfA (318)	spr1754/lyfA	LyfA (318)	Ver texto	(García <i>et al.</i> , 1985; Hölte y Tomasz, 1976)
SP2136	PcpA ^d (621)	SPD_1965	PcpA (680)	spr1945/pspA	PcpA ^d (708)	Adhesina	(Sánchez-Beato <i>et al.</i> , 1998)
SP2190	CbpA (693)	SPD_2017	CbpA (701)	spr1995/pspC	PspC ^e (701)	Unión inmunoglobulina A Interacción con factor H	(Ethies <i>et al.</i> , 1997; Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997; Rosenow <i>et al.</i> , 1997; Smith y Hostetter, 2000; Frolet <i>et al.</i> , 2010)
SP2201	CbpD (448)	SPD_2028	CbpD (448)	spr2008/cbpD	CbpD (448)	Murein hidrolasa implicada en el fraticidio	(Gosink <i>et al.</i> , 2000; Hoskins <i>et al.</i> , 2001; Tettelin <i>et al.</i> , 2001; Eldholm <i>et al.</i> , 2009; Eldholm <i>et al.</i> , 2010)

^a Número de acceso PcpB-PcpC; ^b Nombre alternativo: CbpK (Frolet *et al.*, 2010); ^c Nombre alternativo: Pcp (de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001); ^d Nombre alternativo: CbpN (Frolet *et al.*, 2010); ^e Nombres alternativos: PspA (Hammerschmidt *et al.*, 1997) y PbcA (Hostetter *et al.*, 1997); ND, no determinada; CRP, proteína C-reactiva; * Salto de fase en el marco de lectura.

PspA (proteína de superficie A de neumococo) y PspC (proteína de superficie C) son dos de las más importantes CBPs de *S. pneumoniae* (Tabla 3). Con respecto a PspA —una proteína que une lactoferrina— experimentos llevados a cabo con anticuerpos monoclonales demostraron, incluso antes de determinar la secuencia del gen (Yother and Briles, 1992), que existía una notable variabilidad antigénica entre aislados (McDaniel *et al.*, 1992; Waltman *et al.*, 1990) lo que pudo confirmarse ampliamente años más tarde cuando dichas secuencias estuvieron disponibles (Hollingshead *et al.*, 2000). Además, con los datos actuales de secuenciación masiva, se puede afirmar que el tamaño de PspA varía entre, aproximadamente, 650 y 750 aa, dependiendo de la cepa. El polimorfismo observado en PspA no parece ser exclusivo de esta CBP ya que también ha sido observado en PspC (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Iannelli *et al.*, 2002), una adhesina capaz de unirse al factor H del suero (Dave *et al.*, 2001) inhibiendo así la fagocitosis tanto de células planctónicas como de los neumococos que se encuentran formando biofilmes (Duthy *et al.*, 2002; Domenech *et al.*, 2013). Hasta 11 grupos diferentes de PspC (con tamaños de entre 650 y 750 aa en función de la cepa) han sido encontrados al analizar la secuencia de 43 aislados clínicos de neumococo de los cuales, en 17 casos, la proteína carecía del característico CBD que era sustituido por una secuencia que posee el motivo LPXTG (Iannelli *et al.*, 2002), típico de bastantes proteínas de superficie de bacterias Gram-positivas (Pérez-Dorado *et al.*, 2012). Estas proteínas que ocupan la misma localización genómica que PspC pero que, no obstante, no son CBPs han recibido el nombre de Hic (por *factor H-binding inhibitor of complement*) (Janulczyk *et al.*, 2000).

2.4.1. La autolisina *LytA* de neumococo

La existencia de un notable polimorfismo que afecta en particular al tamaño y, en ocasiones, incluso a la estructura de PspA y PspC comentados en el apartado anterior, no es exclusivo de estas dos CBPs. El gen *lytB*, que codifica una glucosaminidasa implicada en la separación de las células hijas al final de la división celular (García *et al.*, 1999b; De las Rivas *et al.*, 2002;), también muestra notables diferencias entre aislados de neumococo que, en este caso, afectan sobre todo al número de CBRs (Moscoso *et al.*, 2005). Sin embargo, el gen *lytA*, que codifica la principal autolisina de neumococo —una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (NAM-amidasa; *LytA*) (EC 3.5.1.28) (Howard y Gooder, 1974)—, responsable de la típica

autólisis de neumococo al final de la fase estacionaria o cuando se añade Doc al cultivo (García *et al.*, 1985, 1986), representa una excepción ya que, hasta la fecha, todos los alelos *lytA* de *S. pneumoniae* que han sido secuenciados son de la misma longitud (957 pb) codificando proteínas de 318 aa. LytA es una proteína de la superficie bacteriana (Díaz *et al.*, 1989) que interviene en diversos fenómenos fisiológicos importantes de la bacteria. Por un lado, participa (junto con otras enzimas de la pared como LytB) en la separación de las células hijas en el proceso de división celular (Sánchez-Puelles *et al.*, 1986; Ronda *et al.*, 1987; De las Rivas *et al.*, 2002). Por otro lado, desempeña un papel fundamental en la lisis inducida por los antibióticos β -lactámicos (Tomasz *et al.*, 1970; Ronda *et al.*, 1987). Además, LytA está considerada como un importante factor de virulencia por su implicación en gran variedad de funciones biológicas tales como (1) la liberación de fragmentos de pared celular con gran potencial inflamatorio (Tuomanen, 2000; Moreillon y Majcherczyk, 2003; Weidenmaier y Peschel, 2008); (2) liberación de otros factores de virulencia como la neumolisina (Ply) (Marriott *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2013; Vernatter y Pirofski, 2013) así como de ciertas proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune (Martner *et al.*, 2009), el fratricidio (Håvarstein *et al.*, 2006; Eldholm *et al.*, 2009; Pérez-Dorado *et al.*, 2010; Mellroth *et al.*, 2012; Wei y Håvarstein, 2012); (3) inducción de tolerancia a ciertos antibióticos que actúan a nivel de las envueltas celulares (Moreillon y Tomasz, 1988; López *et al.*, 1990; Moscoso *et al.*, 2010, 2011); (4) actuación, junto con Ply, en la evasión de la inmunidad mediada por el complemento y degradación del C3b que se une a la superficie bacteriana (Ramos Sevillano, 2013); (5) la unión del factor C3b a la superficie bacteriana se incrementa notablemente en presencia de anticuerpos específicos y concentraciones subinhibidoras de macrólidos o antibióticos β -lactámicos en un proceso dependiente de la presencia de LytA (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012).

Al igual que el resto de las CBPs, LytA posee una organización modular consistente, en este caso, en un dominio NH₂- (amino-; N-) terminal que corresponde a la región catalítica y un dominio COOH- (carboxi-; C-) terminal que representa el CBD, el cual presenta 7 CBRs. El dominio amino pertenece a la familia denominada *Amidase_2* (PF01510) por la BD Pfam (Punta *et al.*, 2012). Cada CBR de LytA se pliega formando una estructura en horquilla β , dando lugar a una superhélice levógira con forma característica de solenoide que constituye su CBD (C-LytA) (Fernández-Tornero *et al.*, 2001, 2002a, b).

El gen *lytA*, al traducirse, da lugar a una proteína monomérica de baja actividad (forma E) que puede ser activada, *in vitro*, en presencia de colina o de paredes celulares con colina, a bajas temperaturas (debe ser incubada a 0°C durante, al menos, 5 min) dando lugar a una forma enzimáticamente activa denominada forma C. Este fenómeno es conocido como “conversión” (Tomasz y Westphal, 1971; García *et al.*, 1985). La conversión E→C supone la dimerización de la enzima (Romero *et al.*, 2007). Las dos últimas repeticiones del CBD (CBR6 y CBR7) son las implicadas en la formación de este homodímero activo. Más concretamente, los residuos implicados en este proceso son Phe283, Ser286, Trp292, Tyr293 y Tyr294 (situados en CBR6) y Pro305, Phe307, Val309, Leu314, Ile315 y Val317 (en CBR7) (Fernández-Tornero *et al.*, 2001).

2.4.2. Las endolisinas tipo *LytA* de los fagos atemperados de neumococo

Además de los alelos *lytA* de *S. pneumoniae* (*lytA_{Spn}*), todos los fagos atemperados de neumococo descritos hasta el momento poseen genes líticos (o endolisinas) homólogos al de su hospedador y que serán denominados en esta Tesis como alelos *lytA_{PPH}*. Los alelos *lytA* de tipo fágico se encuentran localizados inmediatamente en posición 3' del gen de la holina. Por ejemplo, los genes *hbl* (del fago HB-3) (Romero *et al.*, 1990a, b), *mml* (del fago MM1) (Obregón *et al.*, 2003a) o *lytA_{VO1}* (del fago VO1) (Obregón *et al.*, 2003b) (Tabla 4). Estos alelos *lytA_{PPH}* codifican una proteína de 318 aa, es decir, del mismo tamaño que la *LytA* bacteriana. Hay que destacar que estas enzimas líticas tipo *LytA* que presentan los profagos son muy similares tanto entre sí (con una media de 91.5% de identidad) como cuando se comparan con la NAM-amidasa *LytA* de la bacteria hospedadora (68.3% de identidad) (Romero *et al.*, 2009a). Es notable, sin embargo, que los fagos líticos (o virulentos) de neumococo conocidos (fago Dp-1 o familia de fagos Cp) y que, obviamente, también codifican enzimas líticas, éstas o son de la familia de las lisozimas (o muramidasa; EC 3.2.1.17), como en el caso de los fagos Cp, o NAM-amidasas pero de una familia diferente (clasificada por Pfam como *Amidase_5*; PF05382) a la *LytA* de neumococo y sus profagos (véase más arriba). Sin embargo, resulta destacable el hecho de que la enzima lítica o endolisina del fago Dp-1 (Pal) (Sheehan *et al.*, 1997) es muy similar (72% de identidad) a la codificada (Gp56) por el fago atemperado SM1 de *S. mitis* (Siboo *et al.*, 2003). En muchas ocasiones, los fagos atemperados que se detectan en los diferentes aislados, no son viables sino que son fagos

que han perdido parte de su genoma (fagos incompletos o defectivos) (Ramirez *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2009b).

Tabla 4. PED (%) entre los diferentes tipos de alelos *lytA*.

Alelo <i>lytA</i>	<i>lytA</i> _{Spn}	<i>lytA</i> _{SMG}	<i>lytA</i> _{PPH}	<i>lytA</i> _{SPH}
<i>lytA</i> _{Spn}	≤ 3.2			
<i>lytA</i> _{SMG}	20	≤ 7		
<i>lytA</i> _{PPH}	≥ 14	≥ 21	≤ 3	
<i>lytA</i> _{SPH}			> 15	≥ 15

PED, distancias evolutivas deducidas del alineamiento entre dos secuencias.

*lytA*_{Spn}, alelos *lytA* de *S. pneumoniae*.

*lytA*_{SMG}, alelos *lytA* de SMG distintos de neumococo.

*lytA*_{PPH}, alelos *lytA* de fagos atemperados de neumococo.

*lytA*_{SPH}, alelos *lytA* de fagos atemperados de SMG distintos de neumococo

Existen razones fisiológicas por las que el genoma de estos fagos presenta genes tipo *lytA*. El sistema holina-endolisina constituye la principal estrategia adoptada por los bacteriófagos para lisar sus bacterias hospedadoras al final del ciclo infectivo con el fin de liberar la progenie fágica (Young, 2005). Mientras que las endolisinas (o lisinas), en el caso de los fagos de neumococo, se corresponden con las lisinas tipo *LytA* comentadas anteriormente (Romero *et al.*, 1990a; Obregón *et al.*, 2003a y b; Romero *et al.*, 2009a), las holinas son proteínas con dominios transmembrana que causan lesiones en la membrana citoplasmática del hospedador (Wang *et al.*, 2000; Young, 2005). Recientemente, se ha demostrado que, al revés de lo que se creía, las holinas no representan un requerimiento absoluto para el transporte de las lisinas a la envuelta celular (São-José *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2004), mientras que sí son necesarias para la actividad de las mismas ya que disipan la fuerza protón motriz de la membrana. Debido a la gran similitud entre las endolisinas fágicas y la *LytA* neumocócica, se ha propuesto que también podrían compartir localización y mecanismos de control (Frias *et al.*, 2013). Ambos tipos de proteínas carecen de péptido señal aparente así como de otras proteínas tanto en el genoma del virus como en el de la bacteria que pudieran estar implicadas en su

transporte (Díaz *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1998; Obregón *et al.*, 2003a; López y García, 2004; Frias *et al.*, 2009). Se ha descrito que durante la biosíntesis de los TA, la colina se incorpora a los precursores de los mismos que pasan a través de membrana citoplasmática por un mecanismo biestable (o de *flip-flop*) y se incorporan a la pared celular (Zhang *et al.*, 1999; Damjanovic *et al.*, 2007). Recientemente, se ha comprobado que la colina es crucial para la translocación de la lisina Svl del fago SV1 (Frias *et al.*, 2013) y se ha especulado con que la lisina fágica se podría co-transportar a la pared celular junto con los TA. La LytA bacteriana se ha encontrado preferentemente en el septo de la bacteria, donde se forma el peptidoglicano naciente (Díaz *et al.*, 1989; Mellroth *et al.*, 2012); sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual esta proteína se localiza ahí específicamente aunque, se ha documentado que las nuevas cadenas de TA se incorporan a la pared celular por la zona del septo (Briles y Tomasz, 1970; Tomasz *et al.*, 1971). La localización de LytA podría explicarse si su transporte estuviera asociado a la biosíntesis de los TA como se ha sugerido para las lisinas fágicas.

La disrupción de la fuerza protón motriz provocada por el efecto de la permeabilización causada por la holina en la membrana, dispararía la acción de la lisina (Frias *et al.*, 2013). Sin embargo, se desconoce cómo la fuerza protón motriz estaría reprimiendo a la lisina fágica. Está comúnmente aceptado que la interacción con los LTA regula la actividad de la LytA (Höltje y Tomasz, 1975a; Briese y Hakenbeck, 1985), así como la de las lisinas fágicas (García *et al.*, 1987b). Se ha sugerido que el potencial de membrana hace que los LTA muestren una conformación específica en la superficie de las bacterias Gram-positivas, de tal manera que variaciones en la fuerza iónica del medio podrían resultar en cambios conformacionales de los LTA (Neuhaus y Baddiley, 2003). La pérdida de fuerza protón motriz de la membrana provocada por las holinas induciría una reorganización química y estructural en la envuelta celular que podría anular la función inhibitoria de los LTA sobre las lisinas. Se sugiere que el transporte de TA podría contribuir también a un mecanismo de regulación de la lisina fágica ya que el transporte estaría asociado a su molécula reguladora (Frias *et al.*, 2013).

2.4.3. Las enzimas líticas tipo LytA de otros SMG y sus profagos

Clásicamente, el gen *lytA* se ha considerado como específico de neumococo y conviene recordar que la enzima LytA es la responsable de la “solubilización” de

neumococo por la adición de Doc al 1% y que, con una sólo excepción conocida (Moscoso *et al.*, 2010), todos los aislados clínicos de neumococo se lisan con este detergente, es decir, presentan un gen *lytA* totalmente activo. Únicamente se han encontrado aislados de neumococo con un gen *lytA* parcialmente deletado en aislados del tracto respiratorio de algunos caballos los cuales, obviamente, no se lisaban en presencia de Doc (Whatmore *et al.*, 1999).

En los últimos años, sin embargo, se han ido acumulando evidencias experimentales de que ciertos SMG (*S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* y otros estreptococos) (y algunos de sus profagos; véase más adelante) también poseen un gen tipo *lytA* (*lytA*_{SMG}) que presenta características especiales tanto en su secuencia de nucleótidos como en la respuesta frente a Doc (Díaz *et al.*, 1992a; Obregón *et al.*, 2002; Balsalobre *et al.*, 2006; Llull *et al.*, 2006). Los SMG en los que se ha encontrado un gen *lytA* son insolubles en Doc al 1% debido a que poseen una delección característica de 6 nt en el extremo 3' del gen (codificando en consecuencia una proteína de 316 aa, en lugar de los 318 aa característicos de los alelos *LytA*_{Spn} y *LytA*_{PPH}), además de diversas mutaciones puntuales a todo lo largo del mismo (Díaz *et al.*, 1992a; Obregón *et al.*, 2002). Sin embargo, estos SMG son solubles en Doc al 0.1% o en Tritón X-100 al 1%. Como dato adicional de la presencia de una enzima tipo *LytA* activa, *S. pseudopneumoniae* y los “neumococos atípicos” también se autolisan al final de la fase estacionaria cuando se incuban en las condiciones adecuadas, un fenotipo dependiente de *LytA* en *S. pneumoniae*, como ya se ha mencionado. Si se comparan las secuencias de los alelos *lytA*_{Spn} y *lytA*_{SMG} se pueden detectar polimorfismos característicos de cada tipo de alelos. Llull *et al.* (2006) observaron que más de 100 posiciones nucleotídicas se encuentran conservadas entre todos los alelos de neumococo que, a su vez, difieren de los correspondientes nt presentes en los SMG.

De manera análoga a lo que ocurre en el caso de los fagos atemperados de neumococo, algunos de los profagos encontrados en ciertos SMG también presentan un gen tipo *lytA* (alelos *lytA*_{SPH}) muy estrechamente relacionado con el *lytA*_{Spn} (Tabla 4) (Díaz *et al.*, 1992b; Romero *et al.*, 2004a). En este caso, sin embargo, se han encontrado dos variantes de alelos *LytA*_{SPH}: por un lado, las endolisinas *LytA*_{B6} y *LytA*_{HER} (318 aa) codificadas por los fagos atemperados en las cepas de *S. mitis* B6 y HER, respectivamente, y, por otro, la endolisina Ejl (316 aa), codificada por el profago EJ-1 de la cepa 101/87 de *S. mitis*. Estas *LytA*_{SPH} (tanto las de 318 como la de 316 aa) presentan una serie de peculiaridades con respecto

a la LytA_{Spn} de neumococo: muestran una actividad específica mucho menor en ensayos *in vitro*; su pH óptimo es algo más ácido (5.5 para LytA_{B6} y LytA_{HER} y 6.0 para Ejl); poseen la mutación puntual V317T; su actividad tras la diálisis es muy baja y se inhibe en presencia de Doc al 1% (pero no en presencia de Tritón X-100 al 1%). En la Tabla 5 se muestran las peculiaridades bioquímicas de cada uno de los diferentes tipos de alelos LytA encontrados en neumococo, SMG y los fagos atemperados de ambos. La conversión de la autolisina LytA de neumococo (véase más arriba) es un proceso irreversible mediante diálisis (o sólo tras la desnaturalización irreversible de la enzima) aunque, en el caso de las enzimas líticas Ejl, LytA_{B6} y LytA_{HER} , se ha visto que la sustitución V317T da lugar a una NAM-amidasa que se puede desconvertir reversiblemente por diálisis (Díaz *et al.*, 1992b; Romero *et al.*, 2004a). Tanto la sustitución V317T como la delección de los aa Thr₂₉₀–Gly₂₉₁ (característica de los alelos LytA_{SMG} y de algunos LytA_{SPH}) son responsables de la inhibición por Doc al 1% que presentan este tipo de LytAs en ensayos *in vitro* (Díaz *et al.*, 1992b; Obregón *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2007). Por el contrario, en ensayos *in vivo*, es necesaria la presencia de mutaciones adicionales para que se produzca esta inhibición.

Tabla 5. Comparación de las características de los alelos LytA encontrados en *S. pneumoniae*, SMG y fagos atemperados de ambos.

Alelo LytA^a	Actividad (%)	pH óptimo	Tamaño (aa)	aa ₃₁₇ ^b	Actividad tras la diálisis (%) ^c	Actividad <i>in vitro</i> (%) ^d	
						Doc 1%	Tritón X-100 1%
LytA_{Spn}	100	6.5	318	V	100	100	100
LytA_{SMG}	32–55	6.5	316	V	100	35–57	100
LytA_{PPH}	Baja	6	318	V	ND	ND	ND
$\text{LytA}_{\text{SPH318}}$	33–35	5.5	318	T	10	5–8	100
$\text{LytA}_{\text{SPH316}}$	10	6	316	T	Muy baja	25	ND
$\text{LytA}_{\text{R6(316)}}$	100	ND	316	V	ND	70	100
$\text{LytA}_{\text{R6(T)}}$	100	6.5	318	T	10	30	90

^a LytA_{Spn} , alelos LytA de *S. pneumoniae*; LytA_{SMG} , alelos LytA de los SMG distintos de neumococo; LytA_{PPH} , alelos LytA de fagos atemperados de neumococo (endolisinas LytA_{VO1} , Mml y Hbl); $\text{LytA}_{\text{SPH318}}$, alelos LytA de fagos atemperados de SMG distintos de neumococo de 318 aa (LytA_{B6} y LytA_{HER}); $\text{LytA}_{\text{SPH316}}$, alelos LytA de fagos atemperados de SMG distintos de neumococo de 316 aa (endolisina Ejl); $\text{LytA}_{\text{R6(316)}}$, alelo LytA de la cepa de neumococo R6 al que se le han delecionado los aa Thr₂₉₀–Gly₂₉₁; $\text{LytA}_{\text{R6(T)}}$, alelo LytA de la cepa de neumococo R6 al que se le ha introducido la mutación V317T.

^b Presencia de Val o Thr en la posición 317.

^c Porcentaje de actividad tras la diálisis de la enzima con respecto a la actividad previa a la diálisis.

^d Porcentaje de actividad *in vitro* en presencia de Doc al 1% o de Tritón X-100 al 1% respecto a la actividad en ausencia de detergentes.

ND, no determinado.

II. OBJETIVOS

El gen *lytA* codifica la principal autolisina de *S. pneumoniae* que constituye un importante factor de virulencia. Este gen, considerado inicialmente específico de neumococo, también está presente en otros estreptococos relacionados (SMG) así como en profagos, los cuales estarían actuando como una importante fuente de variabilidad de dicho gen con las implicaciones taxonómicas y clínicas que este hecho pudiera tener. Por otra parte, las técnicas actuales de tipificación de neumococo, presentan una serie de limitaciones económicas, temporales y/o de resolución. Todo ello ha llevado a plantear la conveniencia de realizar un estudio lo más amplio posible sobre la variabilidad alélica que presenta el gen *lytA*, tanto en *S. pneumoniae* como en otros SMG y sus fagos, con el objetivo de determinar si estos nuevos conocimientos podrían optimizar el estado actual en que se encuentra la tipificación neumocócica así como obtener una mayor comprensión del posible origen evolutivo de dicho gen.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos de la presente Tesis son los siguientes:

1. Aportar datos para tratar de determinar el origen evolutivo del gen *lytA* sobre la base de su polimorfismo en estreptococos del grupo mitis (SMG) y sus fagos.
2. Racionalizar las diferencias funcionales entre los homólogos de *LytA* de tipo neumocócico, fágico y SMG sobre la base de variaciones en posiciones específicas de su secuencia.
3. Analizar el contexto genómico del gen *lytA* en *S. pneumoniae* y otros SMG para detectar su posible pertenencia a islas de patogenicidad.
4. Valorar la utilidad del polimorfismo de los genes *lytA* y *galU* en estudios de epidemiología molecular y su aplicación en la tipificación de *S. pneumoniae*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS, FAGOS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las estirpes bacterianas, fagos, plásmidos y oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis se detallan en las Tablas 6 a 12.

Tabla 6. Estirpes bacterianas de *S. pneumoniae* incluidas en las BD

Estirpe (nº de acceso)	Descripción ^a (serotipo o serogrupo/secuencitipo)	Referencia
R6 (AE008540)	NC/ST595 (7, 5, 1, 1, 10, 7, 15)	Hoskins <i>et al.</i> , 2001
Rst7 (M13812)	NC/ST595	García <i>et al.</i> , 1986
R800 (Z34303)	NC/ST595	Mortier-Barrière <i>et al.</i> , 1998
R36A (AJ286760)	NC/ST128 (7, 5, 1, 5, 10, 7, 15)	Arrecubieta <i>et al.</i> , 1994
M24	NC/ST128	Arrecubieta <i>et al.</i> , 1994
BS293 (ABWU01000000)	9V/ST13 (1, 5, 4, 5, 5, 27, 8)	No publicado
BS397 (ABWC01000000)	NT/ST13	No publicado
BS455 (ADHN01000000)	NT/ST2011 (1, 5, 4, 5, 5, 3, 101)	No publicado
BS457 (ABWB01000000)	NT/ST13	No publicado
ST344 (AM113493)	NT/ST344 (8, 37, 9, 29, 2, 12, 53)	Llull <i>et al.</i> , 2006
ST942 (AM113494)	NT/ST942 (8, 10, 15, 27, 2, 28, 4)	Llull <i>et al.</i> , 2006
WL977	NT/ST1705 (2, 94, 2, 65, 2, 151, 14)	No publicado
NCTC 7465 ^T (CAC01000000)	1/ST615 (10, 31, 4, 1, 6, 4, 94)	Donati <i>et al.</i> , 2010
INV104B (FQ312030)	1/ST227 (12, 5, 13, 5, 17, 4, 20)	Donati <i>et al.</i> , 2010
P1031 (CP000920)	1/ST303 (10, 5, 4, 1, 7, 19, 9)	Donati <i>et al.</i> , 2010
SNP1041 (CACE01000000)	1/ST217 (10, 18, 4, 1, 7, 19, 9)	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp03_3038 (FQ312042)	1/ST306 (12, 8, 13, 5, 16, 4, 20)	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp03_2672 (FQ312039)	1/ST306	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp06_1370 (CACJ01000000)	1/ST306	Donati <i>et al.</i> , 2010
13868 (AJ286763)	1/-	Mollerach y García, 2000
519/43	1/-	Mollerach y García, 2000
14388	1/-	Mollerach y García, 2000
CECT 993 ^T (AJ286767)	1/-	Mollerach y García, 2000
N	1/-	Mollerach y García, 2000
L	1/-	Mollerach y García, 2000
D39 (CP000410)	2/ST595	Lanie <i>et al.</i> , 2007
15783/94 (AJ286761)	2/-	Mollerach y García, 2000
406	3/ST260 (26, 9, 15, 14, 9, 16, 19)	García <i>et al.</i> , 1993
494 (AJ243399)	3/-	No publicado
472 (AJ243410)	3/-	Whatmore y Dowson, 1999
OXC141 (FQ312027)	3/ST180 (7, 15, 2, 10, 6, 1, 22)	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp02_1198 (CACH01000000)	3/ST180	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp03_4156 (FQ312045)	3/ST180	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp03_4183 (FQ312043)	3/ST180	Donati <i>et al.</i> , 2010

MATERIALES Y MÉTODOS

Sp07_2838 (CACI01000000)	3/ST180	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp3-BS71 (NZ_AAZ01000000)	3/ST180	Hiller <i>et al.</i> , 2007
Sp99_4038 (FQ312041)	3/ST180	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp99_4039 (FQ312044)	3/ST180	Donati <i>et al.</i> , 2010
A45 (CACG01000000)	3/ST6934 (10, 9, 4, 12, 287, 426, 470)	Donati <i>et al.</i> , 2010
TIGR4 (AE007483)	4/ST205 (10, 5, 4, 5, 13, 10, 18)	Tettelin <i>et al.</i> , 2001
70585 (CP000918)	5/ST289 (16, 12, 9, 1, 41, 33, 33)	Donati <i>et al.</i> , 2010
335 (AJ286765)	5/-	Mollerach y García, 2000
7751 (AJ243414)	6/-	Whatmore y Dowson, 1999
CDC1873-00 (ABFS01000000)	6A/ST376 (6, 11, 1, 1, 15, 72, 77)	No publicado
SP6-BS73 (ABAA01000000)	6A/ST460 (5, 7, 4, 10, 10, 1, 27)	Hiller <i>et al.</i> , 2007
670-6B (CP002176)	6B/ST90 (5, 6, 1, 2, 6, 3, 4)	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp18-BS74 (ABAE01000000)	6B/ST6214 (7, 6, 1, 2, 6, 15, 436)	Hiller <i>et al.</i> , 2007
SSISP6B/1 (AJ286769)	6B/-	Mollerach y García, 2000
ND6012 (AFCA01000000)	6C/ST1692 (1, 5, 7, 12, 17, 158, 14)	Thomas <i>et al.</i> , 2011
07AR0125 (AFBY01000000)	6C/ST1292 (1, 13, 9, 12, 94, 28, 20)	Thomas <i>et al.</i> , 2011
BR1064 (AFBZ01000000)	6C/ST1692	Thomas <i>et al.</i> , 2011
PT8114 (AFCB01000000)	6/ST1390 (10, 13, 1, 43, 98, 1, 20)	Thomas <i>et al.</i> , 2011
CDC1087-00	7F/ST191 (8, 9, 2, 1, 6, 1, 17)	No publicado
(NZ_ABFT01000000)		
219 (AF345846)	7F/-	Whatmore y Dowson, 1999
SSISP7F/1 (AJ286771)	7F/-	Mollerach y García, 2000
6028/95	8/-	Mollerach y García, 2000
SSISP9A/1 (AJ286772)	9A/-	Mollerach y García, 2000
SP195 (NZ_ABGE01000000)	9V/ST156 (7, 11, 10, 1, 6, 8, 1)	Donati <i>et al.</i> , 2010
SP9-BS68 (NZ_ABAB01000000)	9V/ST1269 (7, 11, 10, 1, 5, 76, 14)	Hiller <i>et al.</i> , 2007
10061/38	10A/-	Mollerach y García, 2000
CL18 (AJ243405)	10/-	Whatmore y Dowson, 1999
AP200 (CP002121)	11A/ST62	Camilli <i>et al.</i> , 2008
MLV-016 (ABGH01000008)	11A/ST62 (2, 5, 29, 12, 16, 3, 14)	No publicado
Sp11-BS70 (ABAC01000000)	11D/ST62	Hiller <i>et al.</i> , 2007
SSISP11F/1 (AJ286766)	11F/-	Mollerach y García, 2000
PN15 (AJ243407)	12/-	Whatmore y Dowson, 1999
150 (AF345845)	12/-	Morales <i>et al.</i> , 2010
CDC0288-04 (ABGF01000000)	12F/ST220 (10, 20, 14, 1, 9, 1, 29)	No publicado
SSISP12F (AJ286762)	12F/-	Mollerach y García, 2000
BS292 (ABWQ01000008)	14/ST13 (1, 5, 4, 5, 5, 27, 8)	No publicado
BS458 (ABWA01000000)	14/ST13	No publicado
CCR11974 (NZ_ABZC01000110)	14/ST124 (7, 5, 1, 8, 14, 11, 14)	Feng <i>et al.</i> , 2009
CGSP14 (CP001033)	14/ST15	Ding <i>et al.</i> , 2009
INV200 (FQ312029)	14/ST9 (1, 5, 4, 5, 5, 1, 8)	Donati <i>et al.</i> , 2010
JJA (CP000919)	14/ST66 (2, 8, 2, 4, 6, 1, 1)	Donati <i>et al.</i> , 2010
Sp14-BS69 (NZ_ABAD01000012)	14/ST124	Hiller <i>et al.</i> , 2007
Tupelo (FM865976)	14/ST13	Moscoso <i>et al.</i> , 2010
29044 (AJ243412)	14/-	Whatmore y Dowson, 1999
13783 (AJ286768)	14/-	Mollerach y García, 2000
SSISP15B/1	15B/-	Mollerach y García, 2000

SSISP18C	18C/-	Mollerach y García, 2000
VA1 (AJ243404)	19/-	Whatmore y Dowson, 1999
G54 (CP001015)	19F/ST63 (2, 5, 36, 12, 17, 21, 14)	Dopazo <i>et al.</i> , 2001
Sp19-BS75 (NZ_ABAF01000000)	19F/ST485 (1, 5, 1, 1, 1, 1, 8)	Hiller <i>et al.</i> , 2007
Taiwan ^{19F} -14 (CP000921)	19F/ST236 (15, 16, 19, 15, 6, 20, 26)	Donati <i>et al.</i> , 2010
Canada MDR_19F (ACNV01000000)	19F/ST320 (4, 16, 19, 15, 6, 20, 1)	Pillai <i>et al.</i> , 2009
SSISP19F/1	19F/-	Mollerach y García, 2000
Canada MDR_19A (AC-NU01000000)	19A/ST320	Pillai <i>et al.</i> , 2009
CDC3059-06 (ABGG01000000)	19A/ST199 (8, 13, 14, 4, 17, 4, 14)	No publicado
Hungary ^{19A} -6 (CP000936)	19A/ST268 (7, 13, 42, 6, 10, 6, 56)	Donati <i>et al.</i> , 2010
TCH8431/19A (ACJP01000000)	19A/ST320	No publicado
PN58 (AJ243403)	19A/-	Whatmore y Dowson, 1999
PN8 (AJ2431413)	23/-	Whatmore y Dowson, 1999
233 (AJ243409)	23F/-	Whatmore y Dowson, 1999
234 (AJ243408)	23F/-	Whatmore y Dowson, 1999
SSISP23F/1 (AJ286770)	23F/-	Mollerach y García, 2000
949 (AJ490805)	23F/ST81 (4, 4, 2, 4, 4, 1, 1)	Obregón <i>et al.</i> , 2003a
ATCC 700669 (FM211187)	23F/ST81	Croucher <i>et al.</i> , 2009
S3 (FM865975)	23F/ST81	Moscoso <i>et al.</i> , 2010
Sp23-BS72 (ABAG01000000)	23F/ST37 (1, 8, 6, 2, 6, 4, 6)	Hiller <i>et al.</i> , 2007
SSISP25F/1	25F/-	Mollerach y García, 2000
147 (AF345844)	29/-	No publicado
SSISP33A/1	33A/-	Mollerach y García, 2000
SSISP33B	33B/-	Mollerach y García, 2000
SSISP33C/1	33C/-	Mollerach y García, 2000
SSISP33D/1	33D/-	Mollerach y García, 2000
SSISP33F/1 (AJ286775)	33F/-	Mollerach y García, 2000
1012 (AJ243406)	35/-	Whatmore y Dowson, 1999
7077/39 (AJ286773)	37/ST447 (29, 33, 19, 1, 36, 22, 31)	Mollerach y García, 2000
Dawn (AJ286774)	37/ST1279 (29, 33, 19, 1, 37, 22, 31)	Mollerach y García, 2000
1235/89	37/ST1280 (29, 33, 19, 1, 36, 44, 31)	Mollerach y García, 2000
GA04375 (AFAX01000000)	-/ST236	No publicado
GA17545 (AFGA01000000)	-/ST9057 (7, 388, 1, 17, 6, 1, 104)	No publicado
GA17570 (AFGB01000000)	-/ST156	No publicado
GA41301 (AFGD01000000)	-/ST242 (15, 29, 4, 21, 30, 1, 14)	No publicado
GA41317 (AFGT01000000)	-/-	No publicado
GA47368 (AFGS01000000)	-/ST1339 (6, 11, 1, 67, 15, 72, 14)	No publicado
GA47901 (AFGR01000000)	-/ST304 (13, 8, 13, 5, 17, 4, 8)	No publicado
860 (AJ243411)	-/-	Whatmore y Dowson, 1999

^a NC, no capsulada; NT, no tipificable; ST, secuencitipo; -, desconocido

Tabla 7. Estirpes bacterianas de *S. pneumoniae* (IDIBELL)^a

Descripción (serotipo/secuencitipo) y origen del aislamiento	Estirpe y origen del aislamiento
S1/ST304 (13, 8, 13, 5, 17, 4, 8)	
Sangre	3404, 3474, 4033, 5456, 5796, 6993, 8069
Líquido pleural	3533, 8516, 9458
S1/ST306 (12, 8, 13, 5, 16, 4, 20)	
Sangre	6330, 6441, 6497, 6729, 6810, 6817, 7027, 7212 ^b , 7345, 7361, 7410, 7498, 7518, 7536 ^b , 7557, 7558 ^b , 7629 ^b , 7655, 7840, 8061, 8080, 8120, 8284, 8344, 8431, 8446, 8715, 8874, 9042 ^b , 9270, 9322 ^b , 9494, 9522, 9560, 9572 ^b , 9638
Líquido pleural	5294, 6008, 6746, 7212 ^b , 8056, 8359, 8417, 9509, 9572 ^b , 7536 ^b , 7558 ^b , 7629 ^b , 8084, 8273, 9322 ^b
Espito	9042 ^b , 9521
Líquido cefalorraquídeo	
S3/ST180 (7, 15, 2, 10, 6, 1, 22)	
Sangre	3003, 3086, 4532, 6411, 6979, 7151, 7374, 8205, 8328, 8564
Líquido pleural	7132, 7542, 8199, 8797
Espito	2990 ^c , 5407, 5410, 5814, 6202, 6549, 7312, 8237, 8573
Líquido cefalorraquídeo	1001, 1998, 4066
Absceso	8150
S3/ST260 (26, 9, 15, 14, 9, 16, 19)	
Sangre	1990, 2629 ^b , 2778, 2812, 3227 ^b , 4107, 4520 ^b , 4889 ^b , 4920, 5416, 6952 ^b , 6987, 7207 ^b , 7225, 7300 ^b , 7715 ^b , 7827, 7845, 8173, 8240, 8278 ^b , 8955 ^b
Líquido pleural	3227 ^b , 6612, 6952 ^b , 7386, 8057
Espito	4520 ^b , 4889 ^b , 7207 ^b , 7300 ^b , 7377, 7715 ^b , 8955 ^b
Líquido cefalorraquídeo	2629 ^b , 5788, 8278 ^b
S3/ST1220 (26, 1, 15, 14, 9, 16, 19)	
Sangre	8653
S3/ST717 (5, 35, 29, 1, 45, 39, 18)	
Sangre	8295
S3/ST2314	6316
S19A/ST63 (2, 5, 36, 12, 17, 21, 14)	
Líquido pleural	7796
Espito	5845, 9114
Frotis nasal	5610
S19A/STT81 (4, 4, 2, 4, 4, 1, 1)	
Sangre	3005, 5994, 8331, 9113
Espito	3354, 4142
Absceso	4072, 5086
S19A/ST202 (8, 16, 19, 15, 6, 40, 26)	
Sangre	5986, 7191
Líquido cefalorraquídeo	625, 2124, 4415, 6355
S19A/ST276 (2, 19, 2, 17, 6, 22, 14)	
Sangre	7305, 8050, 8376
Líquido pleural	7270

Espito	7904
S19A/ST320 (4, 16, 19, 15, 6, 20, 1)	
Sangre	8820, 9162, 9490, 9603
Espito	9157
S19A/ST344 (8, 37, 9, 29, 2, 12, 53)	
Sangre	7051
S19A/ST433 (8, 17, 46, 24, 9, 55, 14)	
Sangre	7167, 7466, 8629
S19A/ST450 (10, 13, 14, 4, 17, 95, 14)	
Sangre	7875
S19A/ST1201 (1, 5, 1, 12, 17, 3, 8)	
Sangre	5071, 7111, 7556, 8027, 8413, 8760, 9324
S19A/ST2013 (12, 19, 36, 17, 6, 20, 14)	
Sangre	7102, 8599, 8669, 9085, 9344, 9465
Líquido cefalorraquídeo	8060
Lavado broncoalveolar	9081
S19A/ST2110 (8, 10, 2, 16, 17, 26, 1)	
Sangre	8898
S19A/ST3995 (8, 14, 19, 15, 6, 16, 26)	
Sangre	3694
S19A/ST4000 (8, 2, 36, 17, 6, 20, 14)	
Sangre	8708
S19A/ST4010 (12, 19, 36, 17, 1, 20, 14)	
Sangre	8880

^a IDIBELL, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Estas cepas fueron cedidas por las Dras. J. Liñares y C. Ardanuy.

^b Cepa aislada de muestra mixta.

^c Cepa procedente de un hospital de León.

Tabla 8. Estirpes de SMG

Estirpe (nº de acceso)	Serogrupo ^a	Referencia
<i>S. pseudopneumoniae</i>		
CCUG 48465 (AM113496)	NT	Llull <i>et al.</i> , 2006
CCUG 49455 ^T (AM113495)	NT	Llull <i>et al.</i> , 2006
IS7493 (CP002925.1)	NT	Shahinas <i>et al.</i> , 2011
<i>S. mitis</i>		
101/87 (S43511)	NT	Díaz <i>et al.</i> , 1992a
578 (AM113497)	NT	Llull <i>et al.</i> , 2006
782/1996 (AJ419977)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1078/1997 (AJ419981)	19	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1230/1996 (AJ419978)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1237 (AM113498)	NT	Balsalobre <i>et al.</i> , 2006

MATERIALES Y MÉTODOS

1283/1996 (AJ419979)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1338/1996 (AJ419980)	19	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1383/1997 (AJ419982)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1504 (AM113500)	NT	Llull <i>et al.</i> , 2006
1508/92 (AJ419973)	19	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1629/1997 (AJ419983)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
1956 (AM113501)	NT	Balsalobre <i>et al.</i> , 2006
2410 (AM113503)	NT	Balsalobre <i>et al.</i> , 2006
2859 (AM113499)	NT	Balsalobre <i>et al.</i> , 2006
3072 (AM113504)	NT	Llull <i>et al.</i> , 2006
3137 (AM113502)	NT	Balsalobre <i>et al.</i> , 2006
3198 (AM113505)	NT	Balsalobre <i>et al.</i> , 2006
8224/1994 (AJ419975)	19	Obregón <i>et al.</i> , 2002
10546/1994 (AJ419976)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
11923/1992 (AJ419974)	NT	Obregón <i>et al.</i> , 2002
COL16 (AJ252192)	NT	Whatmore <i>et al.</i> , 2000
COL17 (AJ252190)	NT	Whatmore <i>et al.</i> , 2000
COL20 (AJ252194)	NT	Whatmore <i>et al.</i> , 2000
COL26 (AJ252195)	NT	Whatmore <i>et al.</i> , 2000
COL27 (AJ252196)	NT	Whatmore <i>et al.</i> , 2000
SK597 (CCUG 55094) (AEDV00000000)	NT	Kilian <i>et al.</i> , 2008
SK564 (AEDU01000019.1)	NT	Kilian <i>et al.</i> , 2008
SK1073 (AFQT00000000)	NT	No publicado
SK1080 (AFQV01000006.1)	NT	No publicado
Biovar 2 cepa F0392 (AFUO01000001.1)	NT	No publicado
<i>S. oralis</i>		
SK313 (AFUU00000000)	NT	No publicado
ATCC 49296 ^b (AEPO00000000)	NT	Narikawa <i>et al.</i> , 1995
<i>S. infantis</i>		
SK970 (CCUG 36756) (AFUT00000000)	NT	Kilian <i>et al.</i> , 2008

^a NT, no tipificable.

^b Esta cepa fue originalmente clasificada como *Streptococcus sanguinis* (<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/49296.aspx>).

^T, cepa tipo.

Tabla 9. Profagos de *S. pneumoniae* y *S. mitis*

Fago (nº de acceso)	Referencia
<i>S. pneumoniae</i>	
HB-3 (M34652)	Romero <i>et al.</i> , 1990
MM1 (AJ302074)	Obregón <i>et al.</i> , 2003a
MM1-1998 (DQ113772)	Loeffler y Fischetti, 2006
MM1-2008 (FM21187)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
SV1 (FJ765451)	Frias <i>et al.</i> , 2009
VO1 (AJ490329)	Obregón <i>et al.</i> , 2003b
φSpn_H_1 (CP000936)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_JJA	No publicado
φSpn_OXC	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_3 (AAZZ01000017)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_6 (ABAA01000020)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_11 (ABAC01000001)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_14 (ABAD01000023)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_19 (ABAF01000004)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_23 (ABAG01000010)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_195_1 (ABGE01000002)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_195_2 (ABGE01000013)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_1873 (ABSF01000005)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_3059 (ABGG01000014)	Romero <i>et al.</i> , 2009a
φSpn_670_1	No publicado
φSpn_670_2	No publicado
φSpn_1031	No publicado
φSpn_70585	No publicado
Otros fagos atemperados ^a	
φ625, φ3003, φ3694, φ4066, φ5071, φ5410, φ5610, φ5814, φ5845, φ5986, φ6316, φ6355, φ6411, φ6549, φ6993, φ7167, φ7191, φ7312, φ7466, φ7796, φ7904, φ8027, φ8057, φ8150, φ8205, φ8295, φ8413, φ8564, φ9085, φ9157	Esta Tesis
<i>S. mitis</i>	
EJ-1 (AJ609634)	Díaz <i>et al.</i> , 1992b; Romero <i>et al.</i> , 2004b
φB6 (AJ617816)	Romero <i>et al.</i> , 2004a
φHER (AJ617815)	Romero <i>et al.</i> , 2004a

^a La numeración asignada al profago corresponde con el de la cepa en la que se encuentra.

Tabla 10. Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis

Estirpe	Descripción	Referencia/Origen
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	Novagen
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983

Tabla 11. Plásmidos

Nombre	Descripción ^a	Referencia/Origen
pT7-7	Vector de expresión. <i>bla</i> (Amp ^R)	Tabor, 1990
pMMN1	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA _{R6}	Moscoso <i>et al.</i> , 2010
pMMN2	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA _{Tupelo} [*]	Moscoso <i>et al.</i> , 2010
pGL300	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. pneumoniae</i> ST344	Esta Tesis
pGL400	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. pneumoniae</i> ST942	Esta Tesis
pGL500	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. pneumoniae</i> Sp11-BS70	Esta Tesis
pGL700	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. pneumoniae</i> 8715	Esta Tesis
pGL800	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. pneumoniae</i> 625	Esta Tesis
pGL900	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. pneumoniae</i> 8376	Esta Tesis
pLASG318	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de 318 aminoácidos (Sor_1) (EFU63440.1) de <i>S. oralis</i> ATCC 49296	Esta Tesis
pLASG321	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de 321 aminoácidos (Sor_2) (EFU63974.1) de <i>S. oralis</i> ATCC 49296	Esta Tesis
pLASK313	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. oralis</i> SK313	Esta Tesis
pLASK597	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. mitis</i> SK597	Esta Tesis
pLASK970	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. infantis</i> SK970	Esta Tesis
pLASK1073	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreproduce LytA de <i>S. mitis</i> SK1073	Esta Tesis

^a Amp^R, ampicilín-resistente.

Tabla 12. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'→3') ^a	Utilización/Localización ^{a,e}	Referencia
A028	CAAAAGAGAGTTCATGACGCACTA	Secuenciación <i>lytA</i> _{Ag} /1722744–1722721 /c	Esta tesis
A029	AATACTCGTGGCTTTTAAATTC	Secuenciación <i>lytA</i> _{Ag} /1722620–1722641	Esta tesis
Fag 3	GACACCTCGTAGAGTCAGCAGTG	Secuenciación <i>lytA</i> fágico	Esta tesis
Fag 4	GCCTGGCGTGAAGAACAAATTTAG	Secuenciación <i>lytA</i> fágico	Esta tesis
Fag 5	GGCAGAAAATGGCACTGGCTACTG	Secuenciación <i>lytA</i> fágico	Esta tesis
G-GaiUD	AAAGARATGYTNCNATYGTGRG	Secuenciación <i>galU</i> _{Ag} /1880837–1880858	Mollerach y García, 2000
G-GaiUR	AAYTDTTCHCRACRTTAAC	Secuenciación <i>galU</i> _{Ag} /1881546–1881626 /c	Mollerach y García, 2000
<i>galU</i> int 3'	CAAAGTTGGATGAGGTAATTCTTCAAATC	Secuenciación <i>galU</i> _{Ag} /1881630–1881602 /c	Esta tesis
<i>galU</i> int 5'	CTTGCCAAAGAAATGTTGCCAATCG	Secuenciación <i>galU</i> _{Ag} /1880831–1880855	Esta tesis
LA 3' ext	99GGATGCAAGCTTTTTCAGACCTAATAATATG	Clonación y secuenciación <i>lytA</i> _{Ag} /1722013–1722037	Obregón et al., 2002
LA 3' ext long	GCATAGCTATTAAAGCTTTTTCAGACCTA	Clonación y secuenciación <i>lytA</i> _{Ag} /1722003–172230	Obregón et al., 2002
LA 5' ext	ggggaagagcttttttagctggggg	Clonación secuenciación <i>lytA</i> _{Ag} /1723225–1723206 /c	Esta tesis
LA 3' SG318	TACAAGCTTATTTTCTTATTTTGGTTTGTCACAG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -1	Esta tesis
LA 5' SG318 Ndel	CTGGAAGGGGAATACATATGGATATGATAC	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -1	Esta tesis
LA 3' SG321	CCGAAGCTTGAAGTCTTTCTGTTTTATTATTTTCTTC	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -2	Esta tesis
LA 5' SG321	CTAGCTAGATAGGAGGAGAACCAACCATGGATTTGATACAAAGCAG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -2	Esta tesis
LA 3' SK313	CAAAAAGCTTCAAACTATTGCGTGGGTTGGTG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -3	Esta tesis
LA 5' SK313	GATGAATTGATGAAGAGCTTTAATTGATAGGAGTACCATTAATGG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -3	Esta tesis
LA 5' SK597	GTAATAATGAGAGAGCTTTAATTGATAGGAGTACCATTAATGG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -3	Esta tesis
LA 3' SK1073	GTAGAAGCTTCAAACTCTTAGTTAGTAGTAATCAACCATCAGG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -3	Esta tesis
LA 5' SK1073	GTGGGATCGTGAAGGAGGAGAAATCATGGAAAGTTG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -3	Esta tesis
LA-ATG	GTAATAATGAGAGAGCTTTAATTGATAGGAGTAGCATATGGAAATTAA	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} -3	Esta tesis
LA-Ndel	GATAAGGAGTAGGATATGGAAATTATGTG	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} /1723063–1723015 /c	Moscoso et al., 2010
LA-STOP	TGAAGAGgaTCCATTATTATTTACTGTAATCAAGC	Clonación <i>lytA</i> _{Ag} /1723040–1723011 /c	Esta tesis
MM1-P3	GCTCAGTTGATTGCCATTTC	Identificación y tipificación de profago	Moscoso et al., 2010
MM1-P5	CGACAACGATGGTCACTTTTC	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
MM1-P6	CTCCACACTCTCTTGGCC	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
MM1-P7	CTTTTACATCCAGCCCTC	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
OXCI41-5	CAGATAGGTCAGAGCGTAGAATTG	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
P6-R	GATACACTGTTCAAAACCTCAATTG	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
P9	GATTTTGTGACAGGGACGATTG	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
P8-R	GCGATGTACCCGAGATAGATTG	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
PR2 ph123	GTACGGCATAGGCTCAGAGG	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
PR5 ph123	GCTAAAAACGAAATATGAGAATGCC	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
PR6 ph123	GGAAGGAGGAAATTAATGGCAAC	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b
PR7 ph123	CCAACTGCTCCACCAACACAC	Identificación y tipificación de profago	Romero et al., 2009b

^a En minúsculas, nucleótidos introducidos para crear sitios de restricción; éstos se indican subrayados. H: A, C o T; N: A, C, G, o T; R: A o G; Y: C o T.

^b /c, significa que la secuencia corresponde a la cadena complementaria a la incluida en la BD.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas se conservaron congeladas a -80°C en los diferentes medios de cultivo empleados a los que se añadió glicerol hasta una concentración final del 10% (v/v). En el momento de sembrarlos, los cultivos bacterianos se descongelaron e incubaron en los medios correspondientes a 37°C con (en el caso de cepas de *E. coli*) o sin agitación (en el caso de las cepas de *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, y *S. infantis*). En el caso concreto de los SMG (*S. oralis* SK313 y ATCC 49296, *S. mitis* SK597 y SK1073 y *S. infantis* SK970) se incubaron toda la noche a 37°C debido a su baja tasa de multiplicación. El crecimiento de los cultivos de *E. coli* y de las diferentes cepas de estreptococos, se siguió por turbidimetría a 600 nm (A_{600}) y 550 nm (A_{500}), respectivamente, con un espectrofotómetro Thermo Scientific Elios Epsilon.

Los cultivos de *E. coli* se sembraron en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), añadiendo agar al 1.5% (p/v) para cultivos en medio sólido. La concentración de amplicilina (Amp) para cepas resistentes fue de 100 $\mu\text{g/ml}$. Para el cultivo de *S. pneumoniae* y otros estreptococos se utilizó rutinariamente medio C ajustado a pH 8.0 (CpH8) (Lacks y Hotchkiss, 1960) enriquecido con extracto de levadura al 0.08% (Difco) (C+Y) o el medio Todd-Hewitt con extracto de levadura al 0.4% (THY). Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas de agar de soja tripticaseína conteniendo 5% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid).

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por Difco, Pro-nadisa, Sigma-Aldrich, Roche, Merck o Becton Dickinson.

3. TÉCNICAS DE ADN

3.1. Preparación de ADN cromosómico

El ADN cromosómico de *S. pneumoniae* se preparó utilizando un procedimiento descrito previamente con pequeñas modificaciones (Fenoll *et al.*, 1994). Para ello, las células de un cultivo de entre 3 y 10 ml ($A_{550} \approx 0.6-0.7$) se sedimentaron por centrifugación a $3200 \times g$ durante 10 min a 4°C . Las células se resuspendieron en 0.4 ml de tampón de lisis (Tris-HCl, 50 mM; EDTA, 30 mM; Sarkosyl NL-97, 0.4%; Tritón X-100, 0.1%) (Morrison, 1978) y se incubaron a 37°C hasta la lisis total del cultivo. A los cultivos lisados se les añadió RNasa (100 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron durante 1 h a 37°C . Posteriormente, se trataron con proteinasa K (100–200 $\mu\text{g/ml}$) du-

rante 1 h a 37°C. Las proteínas se eliminaron mediante un tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugación posterior a $12\,000 \times g$ durante 5 min. Para precipitar el ADN, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se añadieron 0.1 volúmenes de acetato potásico 3 M (pH 4.8) y 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo durante 20 min a -20°C y el ADN se sedimentó por centrifugación a $12\,000 \times g$ durante 20 min a 4°C. Para eliminar las sales que pudieran haber coprecipitado con el ADN, se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 4°C durante 10 min. El ADN sedimentado se dejó secar al aire para la eliminación completa del etanol de la muestra que, finalmente, se disolvió en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA).

El ADN cromosómico de las cepas de *S. infantis*, *S. mitis*, y *S. oralis* se preparó utilizando, con pequeñas modificaciones, un procedimiento descrito previamente (Leonard y Carroll, 1997) en el que se emplea la enzima acromopeptidasa para la lisis de los cultivos. Para ello, las células de cultivos de 10 ml ($A_{550} \approx 0.6-0.7$) se lavaron, primero, con 4 ml de una solución de 5 mM EDTA y, posteriormente, con 1 ml de la misma solución. El precipitado se resuspendió en 150 µl de EDTA (5 mM) y se lisaron los cultivos con 1400 U/ml de acromopeptidasa (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37°C. A continuación, se añadieron 125 µl de solución de lisis (SDS 1.3%; Tris-HCl 26 mM, pH 8.0) conteniendo RNasa (100 µg/ml) y se incubó 1 h a 37°C. Posteriormente, se trató con proteinasa K (200 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Para la eliminación de los polisacáridos, se añadió NaCl 0.6 M, bromuro de cetil-trimetilamonio 1% y NaCl 70 mM. Las proteínas se eliminaron mediante un tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a $12\,000 \times g$ durante 5 min. Para precipitar el ADN, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se dejó incubando la solución durante 12-16 h a -20°C y se sedimentó por centrifugación a $12\,000 \times g$ durante 20 min a 4°C. Se realizó un lavado con etanol al 70%, se centrifugó de nuevo y el ADN precipitado se dejó secar al aire. La muestra se disolvió en 50-100 µl de TE.

3.2. Preparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de *E. coli*, se inoculó la cepa correspondiente en 10 ml de medio LB (con Amp) y se incubó a 37°C en agitación durante 12-16 h hasta que alcanzó una A_{600} de 1.5-5. Posteriormente, se purificó el plás-

mido con el sistema comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa (Pronadisa) al 0.7% o 1.5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM, pH 8.1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. A las muestras se les añadió 1/4 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v), xilencianol al 0.2% y EDTA 40 mM (pH 8.0). La electroforesis se llevó a cabo a 100–150 V durante 60 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con GelRed (Biotium) y los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron, según los casos, el ADN del fago λ digerido con BstEII (Amersham) y la forma replicativa del ADN del fago ϕ X174 digerida con HaeIII.

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN se empleó un equipo *Mastercycler gradient* de Eppendorf, y las ADN polimerasas Pfu (Promega) y Taq (Biotools) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las condiciones de la reacción para la amplificación del gen *lytA* de los aislados a partir de ADN cromosómico fueron las siguientes: una fase previa de calentamiento a 95°C durante 5 min, seguida de 28 ciclos que consisten en 95°C de desnaturalización durante 1 min, 52°C de hibridación durante 1.5 min y de 72°C durante 1.5 min para la extensión y, por último, un ciclo de 72°C durante 5 min. En el caso de la amplificación del gen *galU* se utilizaron las mismas condiciones cambiando, únicamente, la temperatura de hibridación a 55°C y el tiempo de extensión a 1 min. Los productos amplificados se purificaron utilizando el kit *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche).

3.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo Abi Prism 3700™ (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el

Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Applied Biosystems y la ADN polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador Gene Amp PCR System 2400 de Perkin-Elmer y fue realizada por la empresa Secugen.

3.6. Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología molecular

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Takara, Amersham o New England Biolabs. La ADN ligasa del fago T4 se adquirió en Takara o New England Biolabs. Las enzimas y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo las indicaciones recomendadas por las respectivas casas comerciales.

4. CLONACIÓN DE GENES *LYTA* Y OBTENCIÓN DE CEPAS DE *E. COLI* HIPERPRODUCTORAS

Para la clonación de los genes *lytA* de los distintos estreptococos se partió del producto de amplificación de dichos genes obtenidos a partir de una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos flanqueantes de cada secuencia (Tabla 12). Los amplicones se digirieron con las endonucleasas de restricción correspondientes y se ligaron al plásmido de hiperexpresión pT7-7 (Tabla 11). Los plásmidos recombinantes se introdujeron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y DH5 α mediante transformación utilizando el método de RbCl (Hanahan, 1983; Sambrook y Russell, 2001).

5. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

5.1. Expresión y purificación de las proteínas *LytA*

Para la purificación de la NAM-amidasa *LytA* se siguió un protocolo descrito previamente (García *et al.*, 1987a) con algunas modificaciones. Brevemente, un cultivo de 1 litro de una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) hiperproductora de dicha proteína se inoculó en medio LB suplementado con Amp (100 μ g/ml) y se incubó a 37°C en agitación hasta que alcanzó una $A_{600} = 0.4$. En este momento, se indujo la expresión de la proteína *LytA* añadiendo 0.1 mM final de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y dejando el cultivo entre 5 y 6 h a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo, el cultivo se dejó en hielo durante 15 min y las células se sedi-

mentaron a $10\,000 \times g$ durante 10 min a 4°C, se lavaron con tampón SP (tampón fosfato sódico 20 mM ajustado a pH 6.9) (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992) y se resuspendieron en 10 ml del mismo tampón. La lisis celular se realizó pasando la suspensión por una prensa de French a una presión de 8.3 MPa y se descartaron los restos celulares con una centrifugación a $15\,000 \times g$ durante 10 min a 4°C. Los extractos celulares se mantuvieron en frío y se pasaron por una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón SP. La columna se lavó con el mismo tampón suplementado con 1.5 M NaCl para eluir las proteínas unidas inespecíficamente a la resina. La proteína LytA se eluyó con el mismo tampón conteniendo 1.5 M NaCl y 2% de cloruro de colina. Posteriormente, se comprobó la pureza de la enzima por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12.5%.

5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron utilizando geles de poliacrilamida en placa ($100 \times 75 \times 1$ mm) a una concentración del 12.5% y siempre en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8; SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%; glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%). Las electroforesis se realizaron a 50 mA (corriente constante) y temperatura ambiente, utilizando un tampón conteniendo Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971). Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular (Bio-Rad) fueron: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa) e inhibidor de tripsina (21.5 kDa).

6. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD EN DOC O TRITÓN X-100

La determinación de la solubilidad de una estirpe de SMG en Doc al 1% o Tritón X-100 al 1%, se llevó a cabo a partir de 0.8 ml de un cultivo en crecimiento exponencial al que se le añadieron 0.1 ml de tampón fosfato 1 M (pH 8.0) y 0.1 ml de Doc/Tritón X-100 al 10%. La mezcla se incubó durante 15 min a 37°C.

7. SENSIBILIZACIÓN DE CULTIVOS A LA AUTOLISINA AÑADIDA EXTERNAMENTE

La sensibilización a la NAM-amidasa LytA añadida externamente se llevó a cabo sobre cultivos de SMG con una $A_{550} = 0.15$ a los cuales se añadió LytA purificada hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ (10 000 U/ml de cultivo). Se incubó durante 1 h a 37°C y se realizó la prueba de solubilidad en Doc descrita en el apartado anterior.

8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

8.1. Aislamiento y purificación de paredes radiactivas

Para el aislamiento y purificación de paredes celulares radiactivas de *S. pneumoniae*, se siguió un método descrito previamente (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). Se partió de un litro de cultivo de la cepa R6 en medio CpH8 en presencia de cloruro de [metil- ^3H] colina (2.22–3.14 TBq/mmol; Amersham) (Mosser y Tomasz, 1970) y se incubó hasta que el cultivo alcanzó una densidad celular aproximada de 4×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml. Seguidamente, se dejó enfriando el cultivo en un baño de agua-hielo durante 10 min y se centrifugó a $3000 \times g$ durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 25 ml de agua destilada fría y se inactivaron las autolisinas calentando la suspensión a 70°C durante 15 min. Posteriormente, se centrifugaron las células a $12\,000 \times g$ durante 10 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 10 ml de agua fría y se procedió a la rotura de las células por medio de bolitas de vidrio con diámetro 150–212 μm (Sigma-Aldrich). Con el fin de eliminar las bolitas, se realizaron dos centrifugaciones sucesivas a 4°C, la primera a $1100 \times g$ durante 5 min y la segunda a $27\,000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se resuspendió en 10 ml de acetona y se volvió a centrifugar a $27\,000 \times g$ durante 10 min. Se realizó un lavado de las paredes celulares con agua destilada y se resuspendieron en 15 ml de solución salina suplementada con DNasa (50 $\mu\text{g/ml}$), RNasa (50 $\mu\text{g/ml}$) y 40 μl de 0.5 M MgCl_2 . Se incubó la suspensión a 37°C durante 30 min y se volvió a centrifugar. El sedimento se resuspendió en 10 ml de solución salina suplementada con 8 mg de tripsina, 20 μl de 1 M CaCl_2 y 100 μl de tolueno. Se incubó la suspensión a 37°C durante 12–16 h. Después de cinco lavados con solución salina, las paredes celulares se resuspendieron en un volumen final de tampón SPSH

(tampón SP 25 mM, pH 8.0; β -mercaptoetanol 20 mM y NaCl 0.15 M) proporcional a 500 000-700 000 cuentas por minuto (cpm)/mL.

8.2. Ensayo de actividad NAM-amidasa sobre paredes de *S. pneumoniae*

Para la realización del ensayo cuantitativo de actividad hidrolítica de LytA sobre paredes de neumococo, se siguió una técnica previamente descrita (Höltje y Tomasz, 1976). A 10 μ l de paredes de neumococo marcadas radiactivamente y de 5 a 50 μ l de la dilución adecuada de la enzima purificada, se añadió tampón SP a pH 6.9 (correspondiente al pH óptimo para esta proteína) hasta un volumen final de 250 μ l. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 10 μ l de seroalbúmina bovina (BSA) (4%), 10 μ l de formaldehído al 35% y trasapando la muestra a un baño de agua-hielo. Posteriormente, la muestra se centrifugó a $12\,000 \times g$ durante 15 min, y a 200 μ l del sobrenadante se le añadió líquido de centelleo para determinar la radiactividad liberada en un contador apropiado. Una unidad (U) de actividad específica enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis (solubilización) de 1 μ g de paredes (≈ 715 cpm) en 10 min.

8.3. Ensayo de actividad enzimática sobre cultivos bacterianos

Los ensayos de la actividad hidrolítica de la enzima LytA sobre cultivos bacterianos fueron realizados sobre cultivos líquidos de diferentes estreptococos (*S. pneumoniae* M32 Δ lytA32; *S. infantis* SK970; *S. mitis* SK597; *S. mitis* SK1073; *S. oralis* SK313 y ATCC 49296). Se incubaron cultivos desde una $A_{550} \approx 0.05$ hasta que alcanzaron una $A_{550} = 0.15$, momento en el cual se añadió la enzima en distintas cantidades. Posteriormente, se siguió la curva de crecimiento de dichos cultivos con el fin de observar el comportamiento de dichas cepas frente a la lisis en la fase estacionaria característica de la actividad LytA.

Paralelamente a éste, se empleó otro procedimiento para el estudio de la actividad enzimática de la proteína LytA sobre cultivos de estreptococos. Este procedimiento consistió en la observación de la lisis de los cultivos en presencia de Doc. Para ello, cuando el cultivo alcanzó una $A_{550} = 0.3-0.4$ (1-2 h tras la adición de la enzima), se tomaron dos muestras de cada cultivo; a una se le añadió Doc (1%, concentración final) y tampón fosfato (0.1 M, pH 8.0) y, a la otra, agua estéril y tam-

pón fosfato (0.1 M, pH 8.0). Se incubaron las muestras a 37°C durante 15–30 min y se midió la A_{550} .

9. ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE FAGOS ATEMPERADOS

Para la determinación de la presencia de profagos en las diferentes cepas de los estreptococos estudiados en esta Tesis, se partió de un cultivo con una $A_{550} \approx 0.08$. Se dejó multiplicarse el cultivo hasta que alcanzó una $A_{550} \approx 0.15$, se añadió mitomicina C (100 ng/ml) (Roche) y se siguió la curva de crecimiento de dicho cultivo para advertir la presencia o ausencia de lisis debida a la inducción del ciclo lítico de los posibles fagos atemperados.

10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

10.1. Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos se construyeron con la herramienta integrada MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) o CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), utilizando el método *neighbour-joining* y un *bootstrap* de 1000 repeticiones para cuantificar el soporte de los nodos de cada árbol. Asimismo, las distancias evolutivas (*pairwise evolutionary distances*; PED) fueron calculadas con el programa DISTANCES incluido en el paquete informático GCG (Devereux *et al.*, 1984) con las correcciones de las distancias requeridas en cada caso.

10.2. Análisis estadístico

La comparación de los datos obtenidos en los ensayos de actividad enzimática de las diferentes proteínas LytA fue realizada por medio de dos pruebas estadísticas; la prueba *t* de Student para comparar el alelo LytA_{1_Spn} con respecto a cada uno del resto de alelos LytA y el test *one way* ANOVA para comparar todos los alelos entre sí. Para ello, se utilizó el programa GraphPad Prism 5. En cada caso, se consideró como significativo un valor $P < 0.05$.

10.3. Técnicas de modelado 3D y predicción de estructura-función de proteínas

Para calcular los perfiles de conservación de la secuencia proteica, se calculó la entropía relativa de cada posición (Wang y Samudrala, 2006), utilizando la frecuencia basal de aminoácidos de las propias secuencias del alineamiento. Los resultados se extendieron al “entorno” del residuo aplicando una ventana de 7 posiciones que equivale, aproximadamente, a la longitud media de un elemento de estructura secundaria. En el cálculo de la entropía relativa, a diferencia del cálculo simple del grado de identidad o similitud de una posición, se tiene en cuenta las frecuencias de cada aminoácido para una determinada posición (no sólo la del más abundante) y se normaliza respecto a la frecuencia de aminoácidos en las proteínas. De este modo, un residuo conservado de un aminoácido poco abundante, como el triptófano, sería más significativo que uno conservado de un aminoácido abundante, como la alanina.

El perfil de uso de codones se analizó mediante análisis de correspondencia de uso de codones sinónimos (aquéllos que codifican el mismo aminoácido) utilizando el servidor CodonW (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=codonw>). Para el análisis se seleccionaron los dos ejes principales, lo que permite visualizar en un gráfico las tendencias con mayor variación dentro del espacio multidimensional de uso de codones de todos los genes de un genoma. Las secuencias genéticas del gen *lytA* de todos los orígenes se localizaron en este gráfico.

Las posiciones determinadoras de especificidad (SDP: *Specificity-determining positions*) se localizaron comparando las secuencias de los distintos clados de los árboles filogenéticos mediante el servidor SDPpred (Kalinina, 2004) usando un umbral de información mutua ≥ 0.5 . Las redes alostéricas (agrupaciones de residuos que tienden a coevolucionar y están relacionados en la transmisión de cambios conformacionales de la proteína asociados a su función) se predijeron con el algoritmo CMAT (*Correlated Mutation Analysis Tool*) (Jeong y Kim, 2012) utilizando 82 secuencias no redundantes al nivel de 100% de identidad.

El modelo estructural del dominio amidasa de LytA se construyó mediante el servidor Swissprot (Arnold, 2006) a partir de una endolisina de un profago de *Bacillus subtilis* (Código PDB: 3HMB), que es el homólogo más cercano con estructura resuelta (21% identidad). Las cavidades (*pockets*) principales del dominio amidasa modelado, se localizaron mediante el algoritmo LISE (Xie y Hwang, 2012).

Las diferentes autolisinas de bacterias Gram-positivas se estudiaron mediante la localización del dominio amidasa utilizando perfiles Pfam aplicando los umbrales específicos de familia sugeridos por los propios responsables del equipo Pfam (Punta, 2012) y las diferentes arquitecturas de dominios en las que aparece el dominio amidasa (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF01510#tabview=tab1>).

10.4. Otros

También se utilizaron otros programas accesibles a través de Internet como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990), CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larkin *et al.*, 2007), CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011) o MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988)

La determinación del secuencitipo (ST) mediante la técnica de MLST se llevó a cabo como se describe en <http://spneumoniae.mlst.net/> (Enright y Spratt, 1998).

La búsqueda de secuencias de inserción (ISs) se realizó con la herramienta accesible en Internet, IS FINDER (<https://www-is.biotoul.fr/>) (Siguier *et al.*, 2006).

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL GEN *LYTA* EN ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO MITIS Y SUS FAGOS

Como ya se detalló en la Introducción de esta Tesis, el gen *lytA* codifica la principal autolisina de *S. pneumoniae*. LytA está considerada como un importante factor de virulencia por su implicación en gran variedad de funciones biológicas tales como la liberación de fragmentos de pared celular con gran potencial inflamatorio (Tuomannen, 2000; Moreillon y Majcherczyk 2003), de otros factores de virulencia como la neumolisina (Martner *et al.*, 2008) y ciertas proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune (Martner *et al.*, 2009), el fraticidio (Håvarstein *et al.*, 2006; Eldholm *et al.*, 2009; Pérez-Dorado *et al.*, 2010) o la tolerancia a ciertos antibióticos (Moreillon y Tomasz, 1988; Moscoso *et al.*, 2010). El gen *lytA*, aunque considerado específico de neumococo, también se ha encontrado recientemente en otros estreptococos relacionados (*S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* y otros SMG) así como en profagos, los cuales podrían estar actuando como una fuente de variabilidad de dicho gen con las implicaciones clínicas y taxonómicas que este hecho pudiera tener. Debido a ello se consideró que era necesario realizar un estudio lo más amplio posible de la variabilidad alélica que presenta el gen *lytA* tanto en *S. pneumoniae* como en otros SMG y diversos profagos.

1.1. Secuencias de *lytA* disponibles en las bases de datos

Para poder estudiar el polimorfismo del gen *lytA* dentro de los SMG y sus profagos y determinar así el posible origen evolutivo de dicha variabilidad, realizamos una búsqueda de todas las secuencias presentes en las BD públicas. Se identificaron 112 entradas diferentes del gen *lytA* que incluían, al menos, los 900 primeros nt del gen sin ninguna indeterminación (Tabla 13). Estas secuencias correspondían a 55 aislados de neumococo (26 alelos *lytA_{Spn}* diferentes) y 28 de SMG (23 alelos *lytA_{SMG}*) así como a 23 profagos de *S. pneumoniae* (19 alelos *lytA_{PPH}*) y 3 de SMG (3 alelos *lytA_{SPH}*).

RESULTADOS

Tabla 13. Alelos *lytA* disponibles en las BD^a

Alelo/familia	Estirpe/fago	Serotipo /serogrupo ^b	Secuencitipo (perfil alélico)	Tamaño (nt) ^c
<u>Neumococos</u>				
1_ <i>Spn</i> /B	Rst7	NC	128	957
	R800	NC	128	957
	R6	NC	128	957
	D39	2	128	957
2_ <i>Spn</i> /B	TIGR4	4	205	957
	CDC1873-00	6A	376	957
	SP6-BS73	6A	460	957
	CDC0288-04	12F	220	957
	CDC3059-06	19A	199	957
	JJA	14	66	957
	150	12	— ^d	940
	147	29	—	937
4_ <i>Spn</i> /A	494	3	—	906
5_ <i>Spn</i> /A	670	6B	90	957
6_ <i>Spn</i> /B	INV104B	1	227	957
7_ <i>Spn</i> /B	PN58	19A	—	906
8_ <i>Spn</i> /A	VA1	19	—	906
9_ <i>Spn</i> /B	CL18	10	—	906
10_ <i>Spn</i> /A	1012	35	—	906
11_ <i>Spn</i> /A	PN15	12	—	906
12_ <i>Spn</i> /A	234	23F	—	906
	233	23F	—	906
13_ <i>Spn</i> /A	949	23F	81	957
	ATCC 700669	23F	81	957
	Sp18-BS74	6B	6214	957
	MLV-016	11A	62	957
	TCH8431/19A	19A	320	957
	Taiwan ^{19F} -14	19F	236	957
	PN8	23	—	906
	7751	6	—	906
	8249	19A	—	957
14_ <i>Spn</i> /A ^e	S3	23F	81	956
15_ <i>Spn</i> /A ^f	ST344	NT	344	957
16_ <i>Spn</i> /B	ST942	NT	942	957
18_ <i>Spn</i> /A	OXC141	3	180	957
	Sp3-BS71	3	180	957
	CDC1087-00	7F	191	957
19_ <i>Spn</i> /A	219	7F	—	940
	SP195	9V	156	957
20_ <i>Spn</i> /A	INV200	14	9	957
	CGSP14	14	124	957
	SP9-BS68	9V	1269	957
	Sp19-BS75	19F	485	957
	Tupelo	14	13	957
	472	3	—	906

RESULTADOS

	860	–	–	906
	29044	14	–	906
21_Spn/A	Sp11-BS70	11D	62	957
22_Spn/B	Sp14-BS69	14	124	957
	CCRI 1974	14	124	957
23_Spn/A	Hungary ^{19A} -6	19A	268	957
	G54	19F	63	957
24_Spn/B	Sp23-BS72	23F	37	957
25_Spn/A	P1031	1	303	957
26_Spn/B	70585	5	289	957

SMG

1_SMG	101/87	NT	–	951
2_SMG	COL17	NT	–	900
3_SMG	COL16	NT	–	900
4_SMG	COL20	NT	–	900
5_SMG	CCUG 49455 ^T	NT	–	951
	CCUG 48465	NT	–	951
	COL26	NT	–	900
6_SMG	COL27	NT	–	900
7_SMG	1508/92	NT	–	951
8_SMG	11923/1992	NT	–	951
9_SMG	8224/1994	NT	–	951
10_SMG	10546/1994	19	–	951
11_SMG	782/1996	NT	–	951
12_SMG	1230/1996	19	–	951
13_SMG	1283/1996	NT	–	951
14_SMG	1338/1996	NT	–	951
15_SMG	1078/1997	NT	–	951
16_SMG	1383/1997	19	–	951
17_SMG	1629/1997	19	–	951
18_SMG	578	NT	–	951
19_SMG	1504	NT	–	951
	1956	NT	–	951
20_SMG	3072	NT	–	951
	3198	NT	–	951
21_SMG	3137	NT	–	951
22_SMG	2410	NT	–	951
23_SMG	1237	NT	–	951
	2859	NT	–	951

Profagos de neumococo (cepa hospedadora)

1_PPH (NK)	HB-3			957
2_PPH (949)	MM1			957
(DCC1808)	MM1-1998			957
(ATCC 700669)	MM1-2008			957
3_PPH (8249)	VO1			957
4_PPH (OXC141)	φSpn_OXC			957
(SP3-BS71)	φSpn-3			957
5_PPH (Hungary ^{19A} -6)	φSpn_H_1			957
6_PPH (SP195)	φSpn_195_1			957
7_PPH (SP195)	φSpn_195_2			957

RESULTADOS

8_PPH (CDC1873-00)	φSpn_1873	957
(SVMC28)	SV1	957
9_PPH (SP11-BS70)	φSpn_11	957
10_PPH (CDC3059-06)	φSpn_3059	957
11_PPH (SP19-BS75)	φSpn_19	957
12_PPH (SP6-BS73)	φSpn_6	957
13_PPH (SP23-BS72)	φSpn_23	957
14_PPH (SP14-BS69)	φSpn_14	957
15_PPH (670)	φSpn_670_1	957
16_PPH (670)	φSpn_670_2	957
17_PPH (JJA)	φSpn_JJA	957
18_PPH (P1031)	φSpn_1031	957
19_PPH (70585)	φSpn_70585	957

Profagos SMG

(cepa hospedadora)

1_SPH (101)	EJ-1	951
2_SPH (HER 1055)	φHER	957
3_SPH (B6)	φB6	957

^a La última fecha de acceso fue el 20 de enero de 2010.

^b NC, no capsulada; NT, no tipificable.

^c Indica el número de nt secuenciados.

^d -, desconocido.

^e La secuencia de este alelo que figura en las BD es incorrecta (véase más adelante).

^f Este alelo codifica una proteína truncada.

1.2. Variabilidad genética de *lytA*

1.2.1. Polimorfismo de los alelos *lytA*_{Spn}

Una vez recopiladas todas las secuencias, el siguiente paso en el estudio de la variabilidad alélica del gen *lytA* y su posible utilidad para el estudio del origen evolutivo de dicho gen consistió en un alineamiento múltiple de los 17 alelos *lytA*_{Spn} cuya secuencia completa (957 pb) estaba disponible. Se observó que éstos se diferenciaban únicamente en 44 nt que darían origen a 13 cambios de aa. En la figura 1 se muestran los sitios polimórficos de los correspondientes alelos pudiéndose observar que, aunque existen dos zonas de mayor concentración de variabilidad (alrededor de los nt 767 y 923), la región que presenta mayor grado de polimorfismo es la situada alrededor del nt 453, hacia la mitad del gen (Fig. 1A). Al analizarse el valor

PED, que proporciona una estimación del número de sustituciones por cada 100 bases, se pudo observar que el polimorfismo entre las posiciones 421 y 480 mostraba un PED de 18.9%, sustancialmente superior a la media del gen (<3.5%) (Morales *et al.*, 2010). Este polimorfismo, sin embargo, no suponía ningún cambio en la secuencia proteica (Fig. 1B). No obstante, un análisis más detallado de la secuencia nucleotídica de la región polimórfica situada alrededor del nt 453, mostró que los 26 alelos *lytA_{Spn}* podían clasificarse en dos familias (Fam_A y Fam_B), según su secuencia (Fig. 1C), de tal manera que los alelos Fam_A y Fam_B incluían secuencias de restricción para las enzimas BamHI (GGATCC) o HincII (GTYRAC), respectivamente. Esta característica podría ser utilizada para una discriminación rápida entre los dos tipos de alelos (Fig. 1D). En el caso de las cepas no tipificables ST344 (*lytA_{16_Spn}*) y ST945 (*lytA_{17_Spn}*), existe un sitio de restricción HincII adicional entre las posiciones 604 y 609. Además de estas peculiaridades, cuando se construyó un árbol filogenético con los 26 alelos *lytA_{Spn}* se pudo observar que los alelos Fam_B formaban un clado independiente y consistente (Fig. 2).

1.2.2. Distribución de los sitios polimórficos en genes *lytA* no neumocócicos

Para determinar el posible origen evolutivo de las dos familias de alelos *lytA_{Spn}*, se llevó a cabo un alineamiento múltiple de los alelos *lytA_{SMG}* y *lytA_{PPH}*. Seguidamente, se determinó la distribución de los sitios polimórficos y se comparó con el realizado para los alelos *lytA_{Spn}* (Fig. 3). Se pudo comprobar que los alelos *lytA* de SMG o de los fagos atemperados son mucho más polimórficos que los de *S. pneumoniae* y los sitios variables se encuentran distribuidos a lo largo de todo el gen (o, en su caso, proteína), a diferencia de lo que ocurre en el caso de los alelos *lytA_{Spn}*. Los alelos *lytA_{SMG}* difieren entre sí en 138 posiciones (35 aa), mientras que los alelos *lytA_{PPH}* lo hacen en 158 (31 aa). Esto sugiere una evolución acelerada de las versiones fágicas, por el propio modo de vida de los fagos, y que los SMG son entidades genéticamente muchas más dispersas que *S. pneumoniae*.

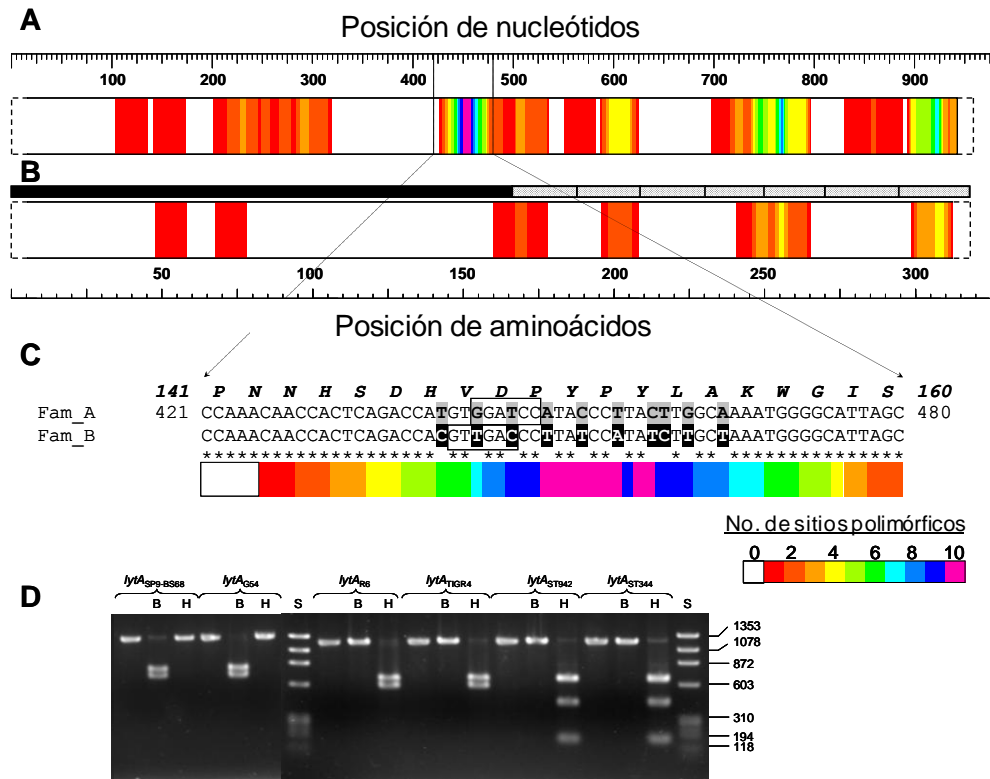


Fig. 1. Sitios polimórficos de los alelos *lytA_{Spn}* y *LytA_{Spn}*. (A y B) Se alinearon únicamente los 17 alelos completos *lytA_{Spn}* (957 pb) y *LytA_{Spn}* (318 aa). Los valores mostrados se calcularon utilizando una "ventana" de 31 nt (u 11 aa) que era desplazada una posición cada vez sobre un alineamiento múltiple y los datos se representan en la posición media de dicha ventana. La barra negra o las punteadas representan las repeticiones del dominio N- y C-terminal de la NAM-amidasa *LytA*, respectivamente. (C) Secuencia de nt alrededor de la posición 453 (tomando el primer nt del codón de inicio ATG como posición 1) que identifica dos familias diferentes de alelos *lytA_{Spn}*. En negrita y cursiva se encuentran resaltadas la secuencia correspondiente de aa de dicha región del gen y sus posiciones. Los asteriscos indican los nt conservados en todos los alelos *lytA_{Spn}* descritos en la Tabla 13. Los nt característicos de cada familia de alelos *lytA_{Spn}* se encuentran resaltados en gris (Fam_A) o en blanco sobre fondo negro (Fam_B). Dentro de los recuadros se indican los sitios de restricción característicos de los alelos *lytA* de la Fam_A (Bam-HI) y Fam_B (HincII). (D) Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones con BamHI (B) y HincII (H). Los alelos *lytA_{Spn}* fueron amplificados utilizando los oligos LA 5' ext y LA 3' ext y purificados antes de ser digeridos con cada una de las enzimas de restricción. Los alelos *lytA_{16_Spn}* y *lytA_{17_Spn}* contienen un sitio de restricción HincII adicional entre las posición 604 y 609. El marcador de tamaño (S) corresponde a ADN de la RF de ϕ X174 digerido con HaeIII; a la derecha de la imagen se muestran los tamaños de los fragmentos (en pb).

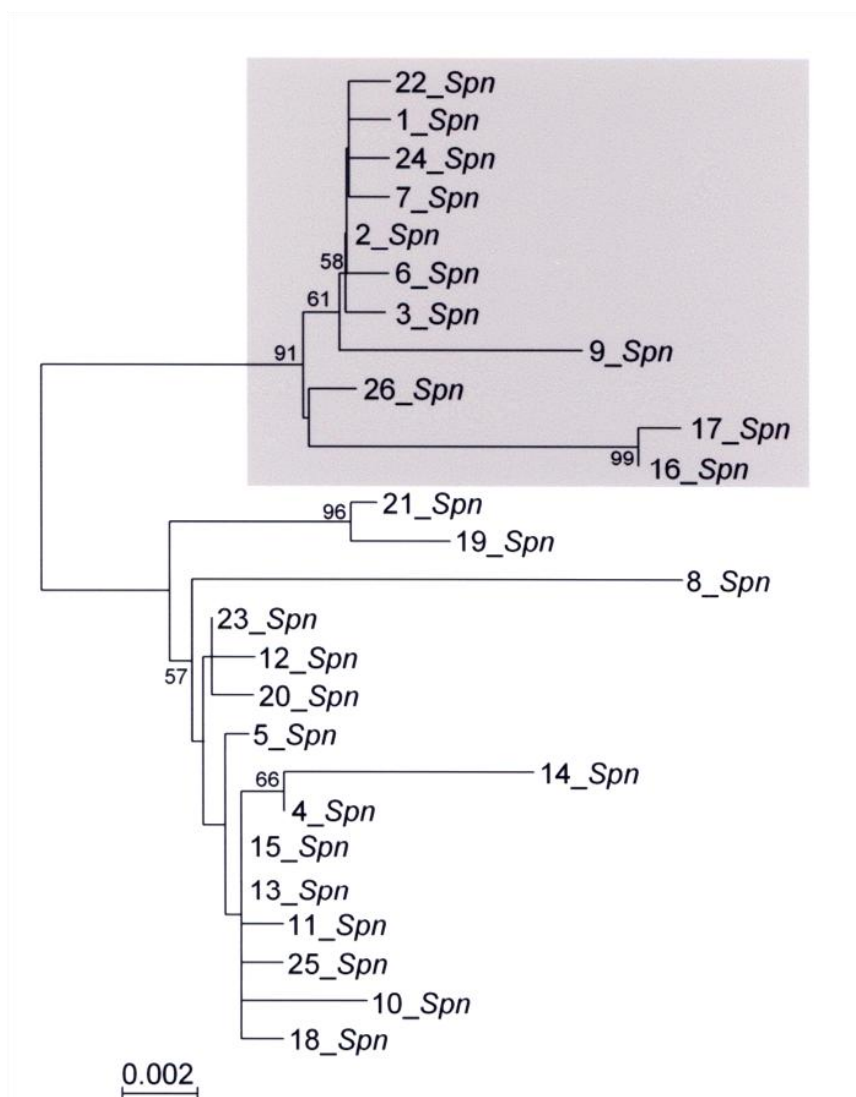


Fig. 2. Árbol filogenético de los alelos *lytA* de *S. pneumoniae*. El filograma muestra las relaciones evolutivas entre los alelos. Para la construcción de este árbol se utilizaron las secuencias que comprenden los 906 primeros nt de los alelos. Se utilizó el método *neighbour-joining* y un *bootstrap* de 1000 para cuantificar el soporte de los nodos de cada árbol. Se indican únicamente los valores de *bootstrap* >50%. El cuadro gris resalta los alelos pertenecientes a la Fam_B. La escala representa el número de sustituciones de nt por sitio.

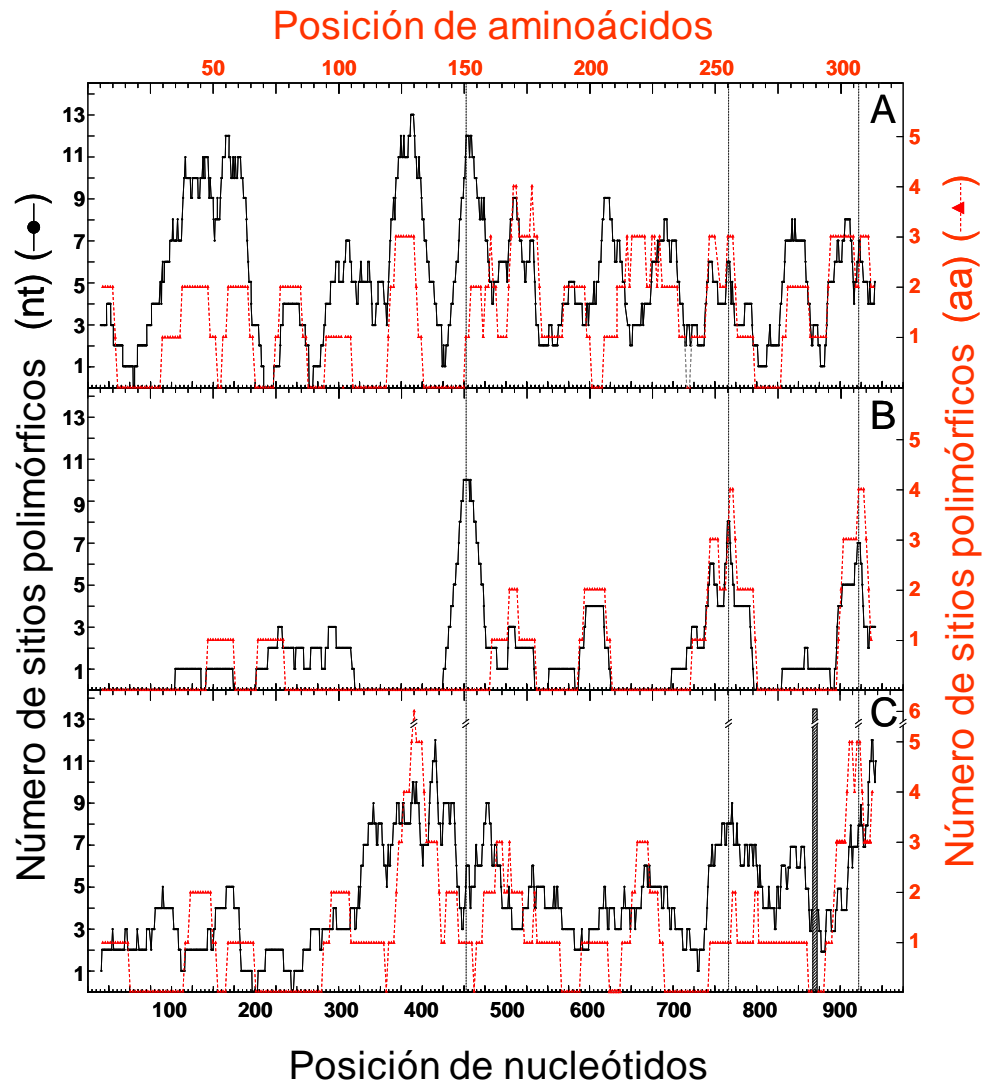


Fig. 3. Distribución de los sitios polimórficos en los alelos *lytA* bacterianos y fágicos y sus correspondientes proteínas. Únicamente se utilizaron los alelos cuya secuencia completa estaba disponible en el momento del análisis. El número de sitios polimórficos se calculó como se indica en el pie de la Fig. 1. Las posiciones de nt y aa aparecen como símbolos negros y rojos, respectivamente. (A) Fagos atemperados de *S. pneumoniae*. (B) *S. pneumoniae*. (C) Estreptococos del grupo mitis (SMG). La barra vertical rayada indica la posición donde se encuentra la delección de 6 nt característica de los alelos *lytA*_{SMG}.

1.2.3. Relaciones filogenéticas entre los genes *lytA* de profagos y hospedador

Para avanzar en el entendimiento de la variabilidad alélica mencionada en el apartado anterior, se realizó un alineamiento múltiple de la región que rodea la posición del nt 453 de los 71 alelos estudiados. Los datos mostrados en la Fig. 4 pusieron de manifiesto que únicamente la secuencia nucleotídica de dos alelos fágicos, *lytA*_{15_PPH} (correspondiente al profago ϕ Spn_670_1 de neumococo) y *lytA*_{2_SPH} (del fago atemperado ϕ HER de *S. mitis*), eran idénticas a la secuencias características de Fam_A y Fam_B, respectivamente, mientras que la mayoría del resto de alelos fágicos presentaban una mezcla de ambas familias. El alelo *lytA* de la cepa hospedadora del profago ϕ Spn_670_1 también pertenece a la Fam_A. Sorprendentemente, ningún alelo *lytA*_{SMG} presentaba dichas secuencias.

Por otro lado, se vio que en el caso de las cepas CGSP14 y SP14-BS69 con serotipo 14 y ST124, la cepa CGSP14 presenta un alelo *lytA* de la Fam_A (*lytA*_{20_Spn}), mientras que SP14-BS69 posee un alelo *lytA* de la Fam_B (*lytA*_{22_Spn}) (Tabla 13 y Fig. 4). En el alineamiento de la secuencias de ambos alelos se pudo observar cómo los dos alelos difieren únicamente en 13 posiciones, 10 de las cuales están localizadas entre las posiciones 441 y 465 (región polimórfica que determina el tipo de familia a la que pertenece ese alelo *lytA*) y, sólo tres posiciones (264, 282, 567) a ambos lados de esta región. Además, en la Fig. 5 se puede ver que los mismos alelos están presentes en aislados que no se encuentran estrechamente relacionados. Por ejemplo, el alelo *lytA*_{20_Spn} (Fam_A) aparece en cepas con ST9, ST13, ST485, ST156 y ST1269 mientras que el alelo *lytA*_{2_Spn} (Fam_B) está presente en aislados de ST66, ST199, ST205, ST220, ST376 y ST460.

RESULTADOS

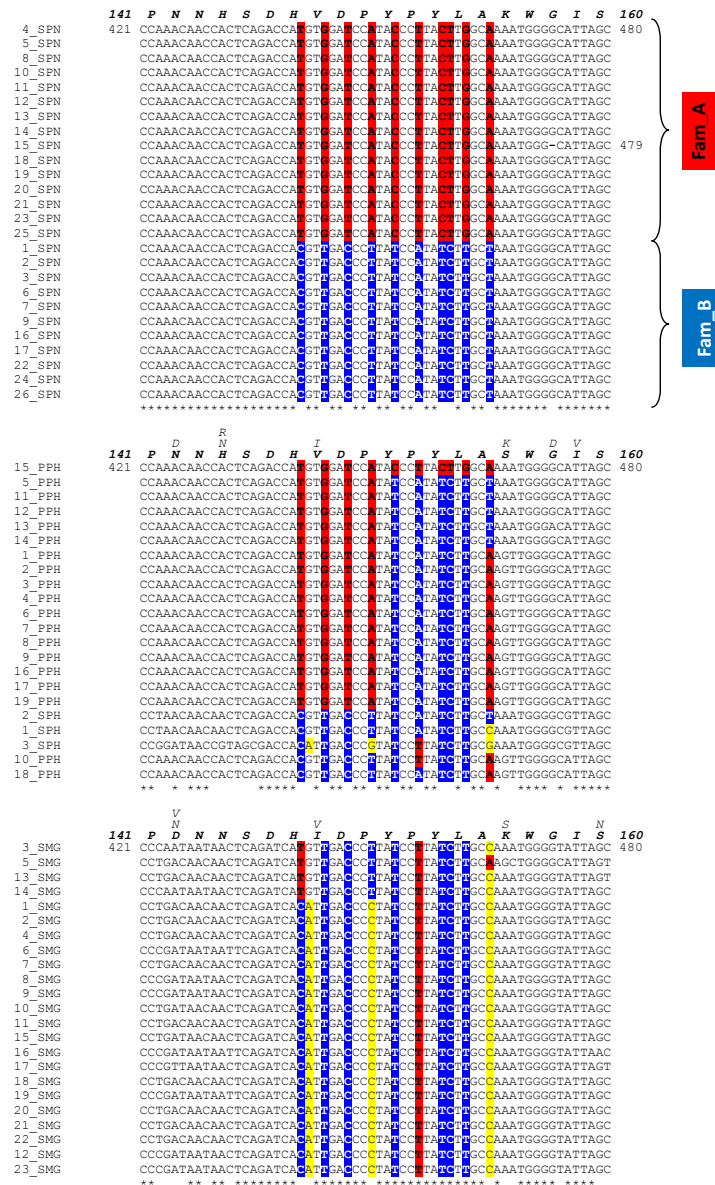


Fig. 4. Alineamiento múltiple de los alelos *lytA* de neumococo, fagos y SMG. En rojo y azul se encuentran resaltados, respectivamente, los nt característicos de la Fam_A y Fam_B. En amarillo, otras posiciones polimórficas. Los asteriscos indican los nt idénticos en todas las secuencias. El guión en la secuencia *lytA*_{15_Spn} corresponde a la delección real de un nt (cepa S3). Se muestran las posiciones de nt y aa (se toma como posición 1 al primer nt del codón de inicio ATG o el primer residuo de la proteína). También se indican los polimorfismos de la secuencia de aa.

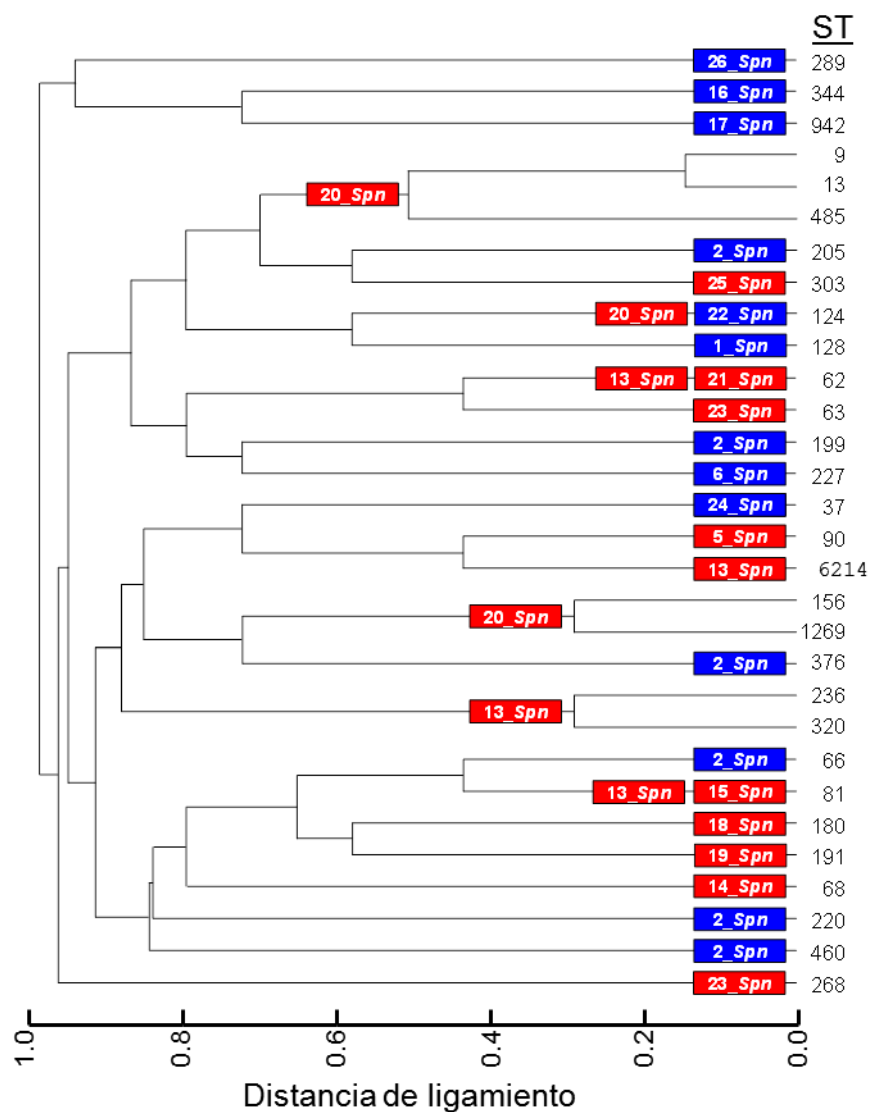


Fig. 5. Dendrograma de los ST de las cepas de neumococo cuya secuencia de nt del gen *lytA* estaba disponible en las BD en enero de 2010. Se muestran los alelos *lytA* correspondientes a cada ST. En fondo rojo y azul se muestran, respectivamente, los alelos de la Fam_A y Fam_B.

2. VALIDACIÓN DE UNA TIPIFICACIÓN ALTERNATIVA DE AISLADOS DE *S. PNEUMONIAE* BASADA EN LOS GENES *LYTA* Y *GALU*

2.1. Utilización de los genes *lytA* y *galU* en estudios filogenéticos de 284 cepas de neumococo

Como ya se ha comentado detalladamente en la Introducción de esta Tesis, las técnicas actuales de tipificación presentan una serie de limitaciones (económicas, de tiempo de realización y/o de resolución taxonómica). Con el fin de tratar de que nuestros conocimientos en la filogenia y peculiaridades del gen *lytA* pudieran aportar algún avance al problema de la tipificación neumocócica, se propuso intentar validar una nueva metodología de secuenciación génica que pudiera ser alternativa (o, al menos, complementaria) a la técnica de tipificación molecular de *S. pneumoniae* que más comúnmente se emplea en la actualidad (MLST). El sistema propuesto por nosotros, estaría basado en el gen *lytA* que, como se acaba de poner de manifiesto, posee un nivel moderado de polimorfismo y una serie de características peculiares. Hay que tener en cuenta que los genes *housekeeping* que se utilizan en las técnicas MLST y MLSA se encuentran muy conservados por lo que es necesario recurrir a secuenciar parcialmente 6 o 7 genes para lograr un poder discriminador suficiente. En nuestro caso, se optó en principio por el análisis de un gen únicamente, para reducir el coste y el tiempo que requieren las técnicas de MLST y MLSA.

Como primera aproximación, se tomó el filograma publicado por Donati *et al.* (2010). Este árbol (denominado “análisis de Donati” a partir de ahora) fue construido utilizando únicamente las 79 171 posiciones polimórficas al alinear las regiones genómicas conservadas (genoma núcleo) de 44 cepas de *S. pneumoniae* (Tabla 14) y, por ello, se puede considerar como el análisis de referencia actual más fiable sobre las relaciones filogenéticas entre cepas diversas de neumococo (Fig. 6). Inicialmente, para analizar la consistencia del MLST en cuanto a estudios filogenéticos, se construyó un árbol utilizando exclusivamente los STs de las 44 cepas mencionadas anteriormente. La mayoría de los nodos de este árbol no tenían un soporte estadístico robusto, a juzgar por sus bajos valores *bootstrap* (Fig. 6). Además, STs que son lo bastante similares como para agruparse dentro del mismo nodo en el árbol de Donati y cols. —ST62 y ST180— en el construido con los MLSTs, se encuentran en nodos diferentes. Incluso dos de las cepas que se agrupaban en uno de los nodos que más soporte estadístico tiene en el árbol basado en el MLST —ATCC

700669 (ST81) y CDC0288 (ST220)—, en el análisis de Donati se encontraban manifiestamente alejadas, situándose mucho más próximas a otras como JJA y CDC1873, respectivamente. Sin embargo, el filograma basado en el MLST sí se ajustaba al genómico en otros nodos como el que contenía a las cepas INV200 (ST9) y CGSP14 (ST15).

Tabla 14. Estirpes utilizadas en la validación de la secuenciación alternativa con la numeración correspondiente de sus alelos *lytA* y *galU*

Descripción (serotipo/ST) ^a	Estirpe	Alelo <i>lytA</i> /LytA (<i>_Spn</i>) ^b	Alelo <i>galU</i> ^c (<i>_Spn</i>)	Origen ^d
NC/ST595	R6	1/1	2	Donati <i>et al.</i> , 2010
	Rst7	1/1	—	BD
	R800	1/1	—	BD
2/ST595	D39	1/1	2	Donati <i>et al.</i> , 2010
1/ST304	8069	2/2	13	Esta Tesis
4/ST205	TIGR4	2/2	24	Donati <i>et al.</i> , 2010
6A/ST376	CDC1873-00	2/2	22	Donati <i>et al.</i> , 2010
6A/ST460	SP6-BS73	2/2	18	Donati <i>et al.</i> , 2010
6C/ST1692	ND6012	2/2	2	BD
	BR1064	2/2	2	BD
12/—	150	2/2	—	BD
12F/ST220	CDC0288-04	2/2	13	Donati <i>et al.</i> , 2010
14/ST66	JJA	2/2	19	Donati <i>et al.</i> , 2010
19A/ST199	CDC3059-06	2/2	19	Donati <i>et al.</i> , 2010
19A/ST450	7875	2/2	19	Esta Tesis
—/ST1339	GA47368	2/2	22	BD
29/—	147	3/15	—	BD
3/—	494	4/3	—	BD
19A/ST1656	8249	4/3	—	BD
6B/ST90	670-6B	5/9	25	Donati <i>et al.</i> , 2010
1/ST227	INV104B	6/8	5	Donati <i>et al.</i> , 2010
1/ST304	3404, 3474, 3533, 4033, 5456, 5796, 6993, 8516, 9458	6/8	5	Esta Tesis
1/ST306	Sp03_2672, Sp03_3038, Sp06_1370	6/8	5	Donati <i>et al.</i> , 2010
	6008, 6338, 6441, 6497, 6746, 6729, 6810, 6817, 7027, 7212, 7345, 7361, 7410, 7498, 7518, 7536, 7557, 7558, 7629, 7655,	6/8	5	Esta Tesis

RESULTADOS

	7840, 8056, 8061, 8080, 8084, 8120, 8273, 8284, 8344, 8359, 8417, 8431, 8446, 8715, 8874, 9042, 9270, 9322, 9494, 9509, 9521, 9522, 9560, 9572, 9638			
-/ST304	GA47901	6/8	5	BD
19A/-	PN58	7/2	-	BD
19/-	VA1	8/11		BD
10/-	CL18	9/12	-	BD
19A/ST433	7167, 7466, 8629	10/3	2	Esta Tesis
35/-	1012	10/3	-	BD
12/-	PN15	11/3	-	BD
23F/-	233, 234	12/10	-	BD
3/ST717	8295	13/3	17	Esta Tesis
6/-	7751	13/3	-	BD
6B/ST6214	Sp18-BS74	13/3	12	Donati <i>et al.</i> , 2010
11A/ST62	MLV-016	13/3	17	Donati <i>et al.</i> , 2010
19A/ST81	3005, 5086	13/3	19	Esta Tesis
	3354, 4142	13/3	20	Esta Tesis
	4072, 5994, 8331, 9113	13/3	10	Esta Tesis
	6511	13/3	-	Esta Tesis
19A/ST320	TCH8431/19A	13/3	20	BD
	CanadaMDR_19A	13/3	20	BD
	8820, 9157, 9162, 9490, 9603	13/3	20	Esta Tesis
19A/ST2110	8898	13/3	10	Esta Tesis
19A/ST3995	3694	13/3	20	Esta Tesis
19F/ST236	Taiwan ^{19F} -14	13/3	20	Donati <i>et al.</i> , 2010
19F/ST320	CanadaMDR_19F	13/3	20	BD
23F/ST81	949	13/3	-	BD
	ATCC 700669	13/3	19	Donati <i>et al.</i> , 2010
23/-	PN8	13/3	-	BD
-/ST nuevo 2	GA17545	13/3	12	BD
-/-	GA41317	13/3	17	BD
23F/ST81	S3	14/T	-	BD
NT/ST344	ST344	15/4	-	BD
19A/ST344	7051	15/4	2	Esta Tesis
NT/ST942	ST942	16/6	-	BD
3/ST180	OXC141, Sp02_1198, Sp03_4183, Sp3-BS71, Sp99_4038, Sp99_4039	17/3	1	Donati <i>et al.</i> , 2010
	3003, 3086, 4066, 4532, 5410, 5814, 6202, 6411, 6549, 6979, 7151, 7312, 7374, 7542, 8150, 8199, 8237, 8328, 8564, 8573,			Esta Tesis

RESULTADOS

	8797			
3/ST260	8057	17/3	1	Esta Tesis
3/ST2314	6316	17/3	1	Esta Tesis
7F/ST191	CDC1087-00	18/5	21	Donati <i>et al.</i> , 2010
7F/-	219	18/5	-	BD
3/ST180	Sp03_4156, Sp07_2838	19/2	1	Donati <i>et al.</i> , 2010
	1001, 2900, 5407, 7132, 8205	19/2	1	Esta Tesis
3/ST260	406	19/2	1	BD
	1990, 2629, 2778, 2812, 3227, 4107, 4520, 4889, 4920, 5416, 5788, 6612, 6952, 6987, 7207, 7225, 7300, 7377, 7386, 7715, 7827, 7845, 8173, 8240, 8278, 8955	19/2	1	Esta Tesis
3/ST1220	8653	19/2	1	Esta Tesis
3/-	472	19/2	-	BD
9V/ST156	SP195	19/2	14	Donati <i>et al.</i> , 2010
9V/ST1269	SP9-BS68	19/2	14	Donati <i>et al.</i> , 2010
14/ST9	INV200	19/2	22	Donati <i>et al.</i> , 2010
14/ST15	CGSP14	19/2	22	Donati <i>et al.</i> , 2010
14/ST13	BS292, BS458	19/2	22	BD
	Tupelo	19/2	-	BD
14/-	29044	19/2	-	BD
19A/ST1201	5071, 7111, 7556, 8027, 8760, 9324	19/2	8	Esta Tesis
	8413	19/2	27	Esta Tesis
19F/ST485	Sp19-BS75	19/2	8	Donati <i>et al.</i> , 2010
NT/ST13	BS457, BS397	19/2	22	BD
NT, 9V/ST13	BS293	19/2	22	BD
-/ST156	GA17570	19/2	14	BD
-/-	860	19/2	-	BD
11A/ST62	AP200	20/7	17	Donati <i>et al.</i> , 2010
11D/ST62	Sp11-BS70	20/7	17	Donati <i>et al.</i> , 2010
14/ST124	Sp14-BS69, CCRI1974	21/2	10	Donati <i>et al.</i> , 2010
19A/ST276	7305, 7904, 8050	21/2	26	Esta Tesis
19A/ST2013	7102, 8060, 8599, 8669, 9081, 9085, 9344, 9465	21/2	26	Esta Tesis
19A/ST4000	8708	21/2	26	Esta Tesis
19A/ST4010	8880	21/2	26	Esta Tesis
NT/ST2011	BS455	21/2	22	BD
1/ST615	NCTC 7465 ^T	22/2	9	Donati <i>et al.</i> , 2010
19A/ST63	5845, 7796, 9114	22/2	22	Esta Tesis
19A/ST268	Hungary ^{19A} -6	22/2	23	Donati <i>et al.</i> , 2010
19F/ST63	G54	22/2	22	Donati <i>et al.</i> , 2010
23F/ST37	Sp23-BS72	23/2	22	Donati <i>et al.</i> , 2010
1/ST217	SNP1041	24/3	9	Donati <i>et al.</i> , 2010

RESULTADOS

1/ST37	P1031	24/3	9	Donati <i>et al.</i> , 2010
5/ST289	70585	25/2	7	Donati <i>et al.</i> , 2010
3/ST180	1998	26/2	15	Esta Tesis
NT/ST1705	WL977	26/2	29	Esta Tesis
–/ST242	GA41301	26/2	5	BD
19A/ST63	5610	27/13	20	Esta Tesis
19A/ST202	625, 2124, 4415, 5986, 6355, 7191	27/13	20	Esta Tesis
–/ST236	GA04375	27/13	20	BD
19A/ST276	7270	28/2	26	Esta Tesis
19A/ST276	8376	29/14	20	Esta Tesis
19A/ST1292	07AR0125	30/3	7	BD
19A/ST1390	PT8114	30/3	7	BD
NC/ST128	R36A, M24	–	2	BD
1/–	1368, 519/43, 14388	–	5	BD
	CECT 993 ^T , L, N	–	9	BD
2/–	15783/94	–	3	BD
5/–	335	–	7	BD
6B/–	SSISP6B/1	–	11	BD
7F/–	SSISP7F/1	–	13	BD
8/–	6028/95	–	17	BD
9A/–	SSISP9A/1	–	14	BD
10A/–	10061/38	–	14	BD
11F/–	SSISP11F/1	–	8	BD
12F/–	SSISP12F	–	4	BD
14/–	13783	–	10	BD
15B/–	SSISP15B/1	–	12	BD
18C/–	SSISP18C/1	–	2	BD
19F/–	SSISP19F/1	–	12	BD
23F/–	SSISP23F/1	–	12	BD
25F/–	SSISP25F/1	–	6	BD
33A/–	SSISP33A/1	–	17	BD
33B/–	SSISP33B	–	10	BD
33C/–	SSISP33C/1	–	2	BD
33D/–	SSISP33D/1	–	2	BD
33F/–	SSISP33F/1	–	17	BD
37/ST447	7077/39	–	15	BD
37/ST1279	Dawn	–	16	BD
37/ST1280	1235/89	–	15	BD

^a NC, no capsulada; NT, no tipificable; ST, secuencitipo; –, desconocido.

^b T, proteína trunca

^c –, desconocido.

^d BD, secuencias disponibles en las BD pero no incluidas en el trabajo de Donati *et al.* (2010).

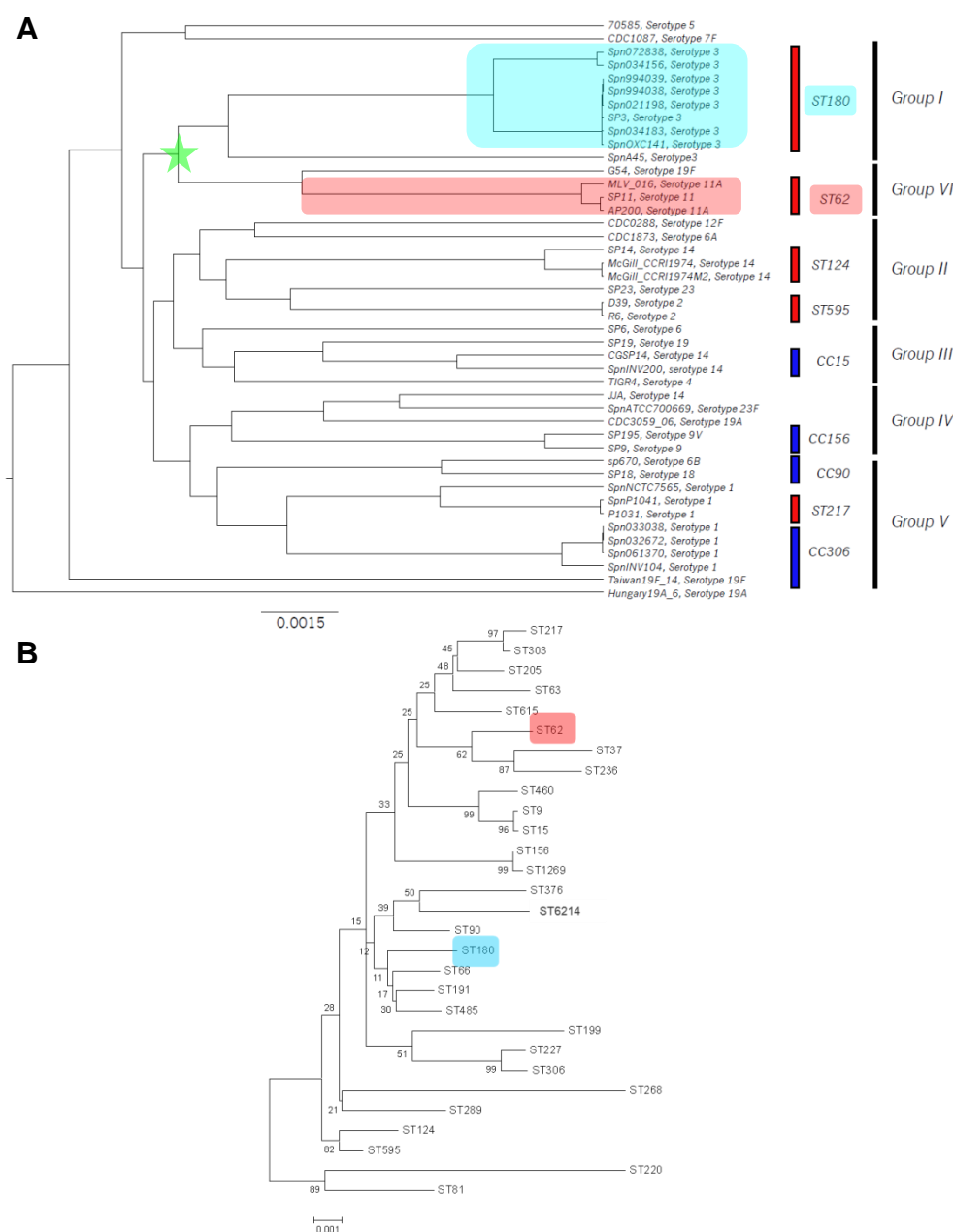


Fig. 6. Filogramas de las 44 cepas estudiadas en el análisis de Donati *et al.* (2010). (A) Filograma construido a partir de la secuencia del genoma completo de cada cepa. (B) Filograma construido a partir del ST de cada cepa. Los cuadros azules indican las cepas correspondientes al ST180 y, los rojos, las del ST62. La estrella verde marca el nodo común al que pertenecen las cepas de ambos STs. La escala representa el número de mutaciones por nt.

Considerando la inconsistencia del MLST para discernir entre casos concretos, se planteó si la secuencia completa del gen *lytA* (957 pb) podría ser utilizada alternativamente como un marcador sencillo de análisis filogenético. Para ello, se recopilaron las secuencias de este gen en las 44 cepas de referencia. Se descubrió que el gen *lytA* de la cepa 8249 no se correspondía con la secuencia publicada y presente en las BD (véase nota ^e de la Tabla 13) presentando esta cepa el alelo 4 en lugar del 14. Por esta razón, se tuvieron que reenumerar los alelos *lytA* (Tabla 14). Se construyó el filograma correspondiente a los alelos *lytA*_{Spn} de las 44 cepas de referencia (Fig. 7A). Este filograma no era lo suficientemente consistente ya que los alelos *lytA*_{17_Spn} (cepa OXC141) y *lytA*_{19_Spn} (cepa Sp03_4156) no se localizaban en el mismo nodo, al igual que los alelos *lytA*_{13_Spn} (cepa MLV-016) y *lytA*_{20_Spn} (AP200), mientras que en el árbol basado en el genoma completo sí lo hacían en ambos casos.

A la vista de estos resultados se consideró conveniente incluir al gen *galU* en el nuevo sistema de tipificación, por tratarse de un gen altamente polimórfico y que podría complementar notablemente el grado de discriminación entre estirpes proporcionado por la secuenciación de *lytA*. El gen *galU* de *S. pneumoniae* (Bonofiglio *et al.*, 2005, 2012) codifica la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (UDP-glucosa pirofosforilasa o UDPG:PP; EC 2.7.7.9) (299 aa) que cataliza la formación de UDP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato y UTP (Frey, 1966). La UDP-glucosa es un componente clave en la ruta de biosíntesis del CPS que, como ya se ha mencionado, constituye el factor de virulencia *sine qua non* de neumococo. Se ha comprobado que los mutantes *galU* de neumococo carecen de cápsula y que, por lo tanto, son avirulentos (Mollerach *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2008). GalU se ha descrito también entre las proteínas extracelulares de *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (Mao *et al.*, 2008). La UDPG:PP es una enzima universal, aunque la enzima presente en procariotas y la de los eucariotas no se encuentran relacionadas evolutivamente (Mollerach *et al.*, 1998). Se ha encontrado que las PEDs entre los diferentes alelos *galU* encontrados hasta ahora varían entre 0.2-24% entre los aislados de neumococo y 1.4-43.4% cuando se incluyen los alelos de otros estreptococos. Este elevado polimorfismo entre proteínas del mismo tamaño es inusual en *S. pneumoniae* lo que ha llevado a sugerir su posible uso como herramienta de tipificación de *S. pneumoniae*, alternativa o complementaria a las que actualmente se utilizan (Mollerach y García, 2000). Por lo tanto, se procedió al análisis de la consistencia del gen *galU* para su uso en tipificación. Teniendo en cuenta trabajos anterior-

res de nuestro laboratorio (Mollerach y García, 2000), el análisis se focalizó en 594 pb (desde el nt 148 hasta el 741) en lugar de las 900 pb que tiene el gen *galU* completo. Los alelos *galU* se numeraron según la descripción de este trabajo previo. Se puede observar cómo el árbol construido con el gen *galU* es consistente ya que, por ejemplo, sitúa en el mismo nodo el alelo *galU*_{1_Spn} (correspondiente a las cepas 072838, 034156, OXC141, etc.) y el alelo *galU*_{17_Spn} (correspondiente a MLV_016, SP11_BS70 y AP200), al igual que el árbol basado en el genoma completo (Fig. 7B). No obstante, hay que señalar que, al igual que ocurre con el árbol basado en el ST, también hay casos en los que esta correspondencia no es precisa; por ejemplo, las cepas SP14_BS69 y CCRI1974 (*galU*_{10_Spn}) se encuentran situadas más próximas (tomando el genoma completo) a R6 (*galU*_{2_Spn}) que a SP6_BS73 (alelo *galU*_{18_Spn}).

El análisis de los filogramas reveló, además, que, mediante su alelo *lytA*, las cepas de neumococo se podían clasificar en dos familias lo que confirmaba resultados previos (esta Tesis, apartado 1.2.1) y, en otras dos, mediante el *galU* (denominadas I y II) (Fig. 8). Teniendo en cuenta ambas clasificaciones y dependiendo de la combinación de alelos *lytA* y *galU*, se pudieron ordenar las diferentes cepas en cuatro grandes grupos (numerados del 1 al 4). Se construyó el árbol filogenético correspondiente a la concatenación de los genes *lytA* y *galU* de las 44 cepas y se localizaron dichos grupos tanto en este árbol como en el de referencia de Donati *et al.* (2010) (Fig. 9). Ambos árboles presentaban, aún con algunas excepciones, una patente similitud.

RESULTADOS

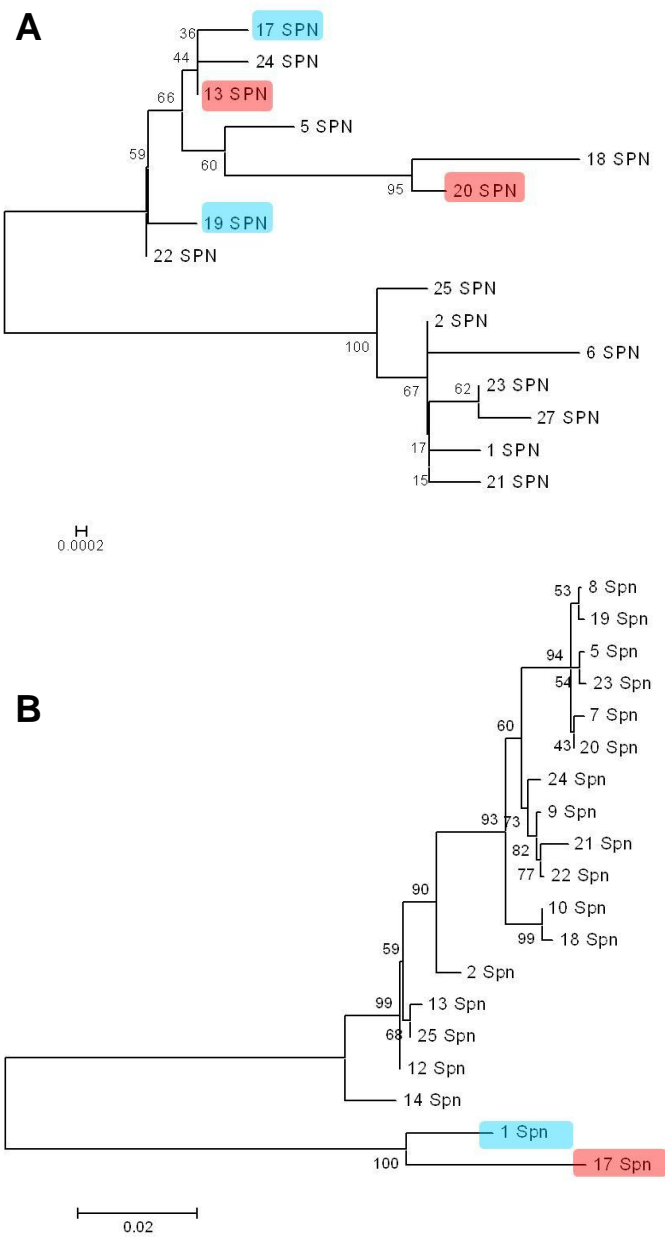


Fig. 7. Filogramas correspondientes a las 44 cepas estudiadas en el análisis de Donati *et al.* (2010). (A) Gen *lytA*. (B) Gen *galU*. Los cuadros azules indican las cepas correspondientes al ST180 y, los rojos, las de ST62. La escala representa el número de mutaciones por nt.

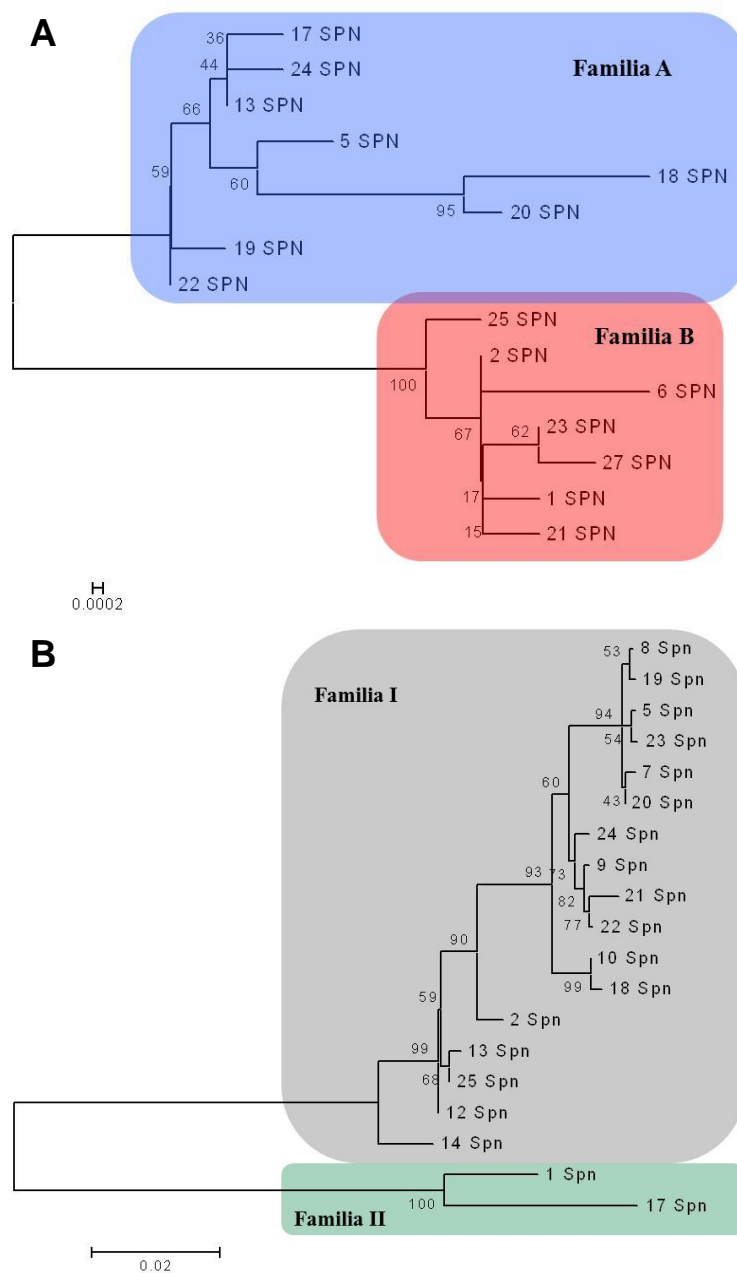


Fig. 8. Filogramas correspondientes a las 44 cepas estudiadas en el análisis de Donati *et al.* (2010). (A) Gen *lytA*. (B) Gen *galU*. La escala representa el número de mutaciones por nt.

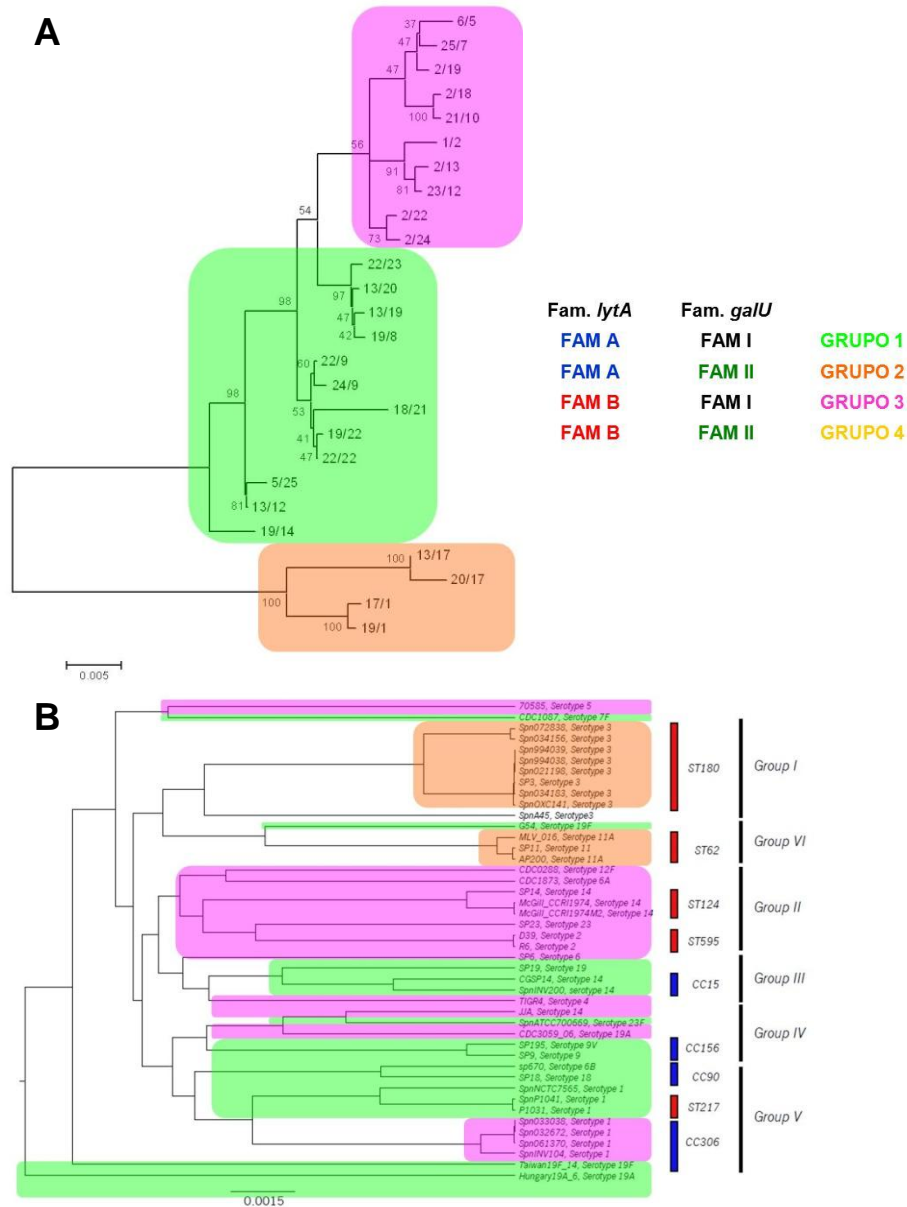


Fig. 9. Filogramas de las 44 cepas estudiadas en el análisis de Donati *et al.* (2010). (A) Concatenación de los genes *lytA* y *galU*. (B) Genoma completo. Los cuadros de color verde, naranja, fucsia o amarillo indican, respectivamente, las cepas correspondientes a los grupos 1 al 4. La escala representa el número de mutaciones por nt.

Como un paso adicional en el intento de validar la secuenciación de los genes *lytA* y *galU* como técnica de tipificación molecular, se determinó la secuencia de ambos genes a partir de 164 aislados clínicos de neumococo cedidos por la Dra. J. Liñares del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) (Tabla 14). Estos aislados se eligieron por su gran interés clínico por corresponder a los serotipos con mayor incidencia clínica en España (1, 3 y 19A) (Liñares *et al.*, 2010; Ardanuy *et al.*, 2012; Selva *et al.*, 2012; Ciruela *et al.*, 2013). Se obtuvieron dos alelos no descritos hasta el momento (*lytA*_{28_Spn} y *lytA*_{29_Spn}) lo que elevó el número total a 30 alelos *lytA* no redundantes (entre los disponibles en las BD y los descritos en este trabajo). En el caso del gen *galU*, se encontraron también dos alelos nuevos (*galU*_{26_Spn} y *galU*_{27_Spn}) para un total de 29 alelos *galU* diferentes. Se volvieron a calcular los PED de los genes *lytA* (906 pb) y *galU* (594 pb) incluyendo los alelos nuevos descritos en esta Tesis. Se obtuvieron valores de 0.11–3.27% para el gen *lytA* y 0.17–24.86% para *galU*. Posteriormente, se construyeron los correspondientes filogramas a partir de los alelos *lytA* (se utilizaron solamente los alelos completos) y *galU*, así como mediante la concatenación de los mismos tanto de los aislados clínicos como de las secuencias presentes en las BD (Fig. 10) obteniéndose resultados comparables a los obtenidos en el análisis de Donati.

RESULTADOS

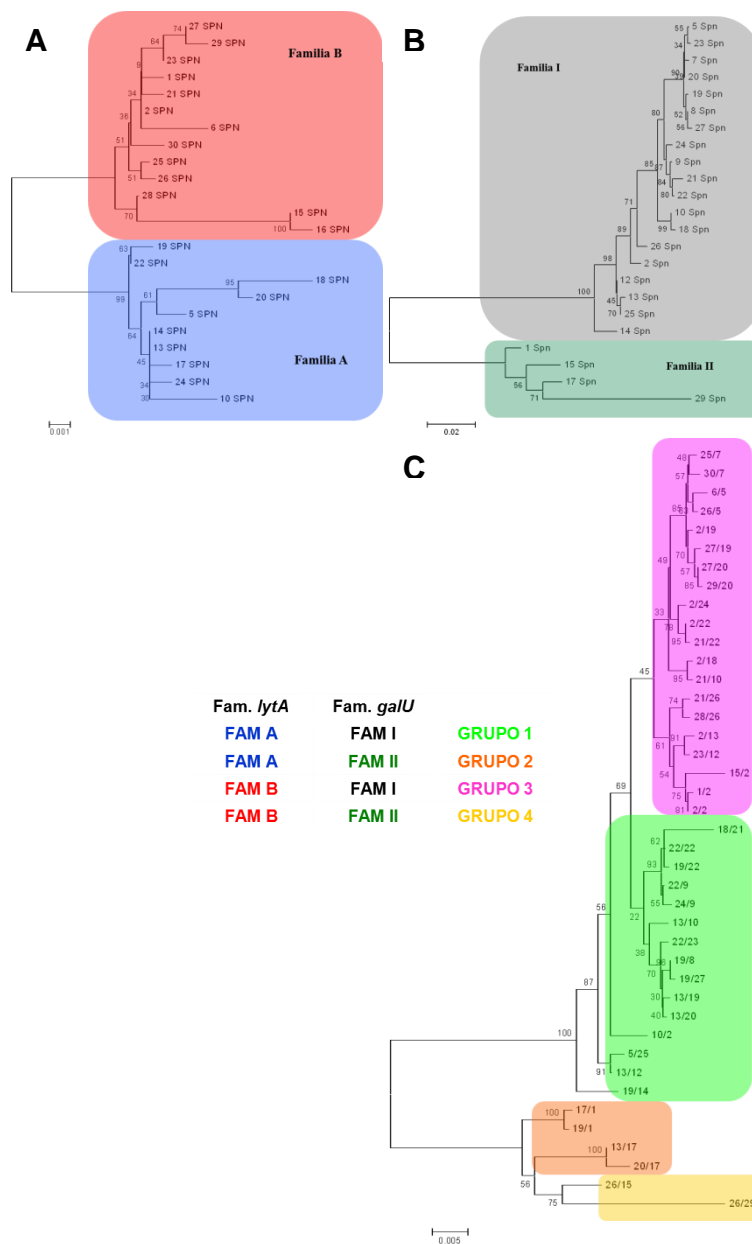


Fig. 10. Filogramas calculados a partir de las secuencias disponibles en las BD y de las cepas clínicas secuenciadas en este trabajo. (A) Gen *lytA* (957 pb) (B) Gen *galU* (594 pb). (C) Concatenación de las secuencias de *lytA* y *galU*. Los cuadros de color verde, naranja, fucsia o amarillo indican, respectivamente, las cepas correspondientes a los grupos 1 al 4. La escala representa el número de mutaciones por nt.

2.2. Análisis estadístico comparativo entre el MLST y la tipificación con los genes *lytA* y *galU*

Con el fin de ponderar la validez de las secuencias de estos dos genes para tipificar aislados neumocócicos, se diseñaron dos aproximaciones en las que se consideraban las distancias como continuas en un caso y como discretas (basada en clases) en otro. Respecto a la aproximación continua, se extrajeron todas las distancias filogenéticas entre todos los pares de cepas de Donati, utilizando el árbol publicado en el artículo original (proporcionado amablemente por el propio autor) y se compararon con el grado de identidad compartido por los alelos respectivos. En el caso de *lytA* y *galU*, se observaron dos poblaciones mayoritarias de puntos (correspondientes a las dos familias) que se extendían paralelamente por el eje X, por lo que las distancias entre estos alelos no se correspondían con las distancias genómicas (Figs. 11A y B). La concatenación de ambos genes no mejoró significativamente el resultado anterior (Fig. 11C). Sin embargo, la concatenación de los seis genes del sistema MLST mostró un comportamiento mucho más compacto ya que las distancias eran proporcionales a las genómicas ($R^2 = 0.33$) (Fig. 11D). Esta diferencia todavía fue patente cuando se consideraron únicamente cepas correspondientes a los tres serotipos más patógenos (Fig. 11E).

Por otra parte, en la aproximación discreta se clasificaron las 44 cepas según sus alelos *lytA*, *galU* o combinación de éstos y se evaluó si cada uno de ellos se correspondía con uno solo de los 21 serotipos incluidos. De este modo, si cada alelo—dentro de una lista finita— correspondiera a un solo tipo de serotipo permitiría la asignación inmediata; mientras que, en caso contrario, se producirían clasificaciones cruzadas, o ambigüedades, que reducirían el valor clasificatorio del gen o genes. Adicionalmente, es deseable un bajo número de clases (alta inclusividad) para no incurrir en una partición excesiva del espacio taxonómico.

El uso de los alelos *lytA* incurrió en clasificación cruzada para 15 cepas y el de *galU* para 5. Esto indicaba que el empleo de alelos *lytA* y *galU*, por separado, no resultaba práctico para predecir serotipo aunque *galU* era más prometedor. Cuando la secuencia de ambos genes se concatenó se observaron sólo dos ambigüedades (la combinación *lytA*_{20_Spn}–*galU*_{17_Spn} clasifica de manera cruzada dos cepas, con serotipo 11A y 11D; la combinación *lytA*_{2_Spn}–*galU*_{19_Spn} clasifica de manera cruzada dos cepas, con serotipo 14 y 19A) mientras que el MLST sólo una (el ST62 clasificó a una cepa serotipo 11A junto a otra con serotipo 11D). Sin embargo, *lytA-galU* utilizó sólo 27 clases mientras que MLST usó 28 (menor inclusividad) lo que asemeja el

RESULTADOS

poder estadístico de la capacidad de ambos sistemas (5.3×10^{-5} y 3.6×10^{-5} para *lytA-galU* y MLST, respectivamente; análisis por Chi-cuadrado) para clasificar en comparación con el azar o hipótesis nula (los alelos se distribuyen aleatoriamente en las cepas por recombinación).

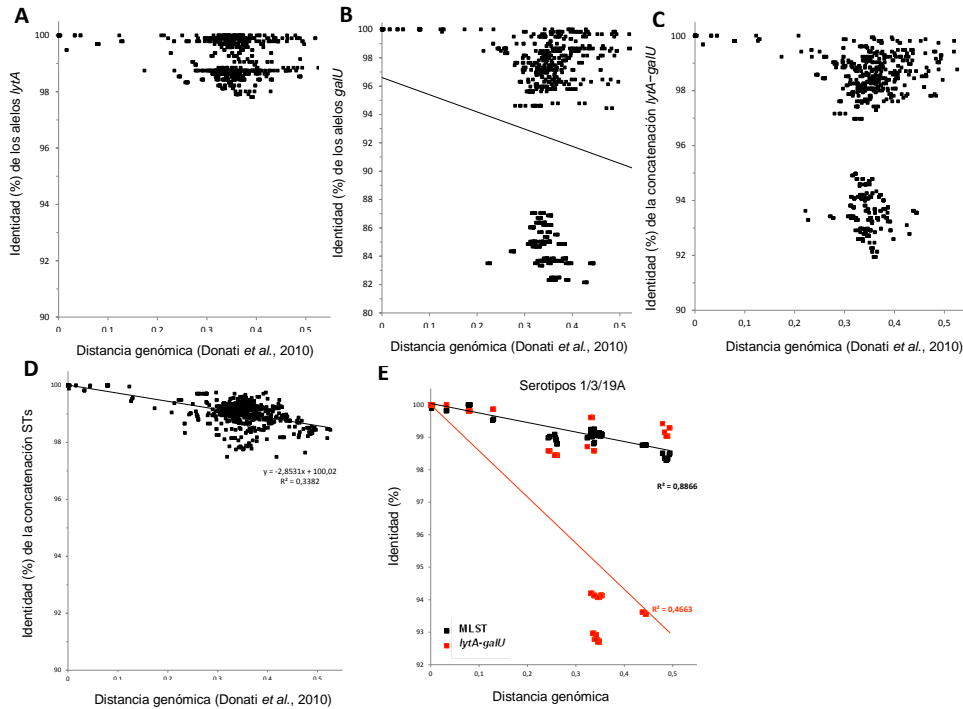


Fig. 11. Correspondencia entre las distancias filogenéticas de las cepas de Donati, sus alelos *lytA* y *galU* y sus ST. (A) *lytA*. (B) *galU*. (C) Concatenado *lytA-galU*. (D) ST. (E) Concatenado *lytA-galU* y ST para cepas de los serotipos 1, 3 y 19A.

Para comprobar si resultados similares se obtendrían en otros grupos de cepas pertenecientes a los serotipos más patógenos, el ensayo se amplió a 164 aislados clínicos de los serotipos 1, 3 y 19A. Mientras que ni *lytA-galU* ni el MLST incurrieron en ambigüedad alguna, el primer sistema lo hizo con menos clases (19) que el se-

gundo (21). La mayor inclusividad (menor número de clases) del sistema *lytA-galU* respecto al MLST le hacía presentar una significación estadística algo mayor (valor de P : 5×10^{-188} frente a $\times 10^{-178}$).

3. EL GEN *LYTA* DE LOS FAGOS ATEMPERADOS DE *S. PNEUMONIAE*

Muchos de los alelos del gen *lytA* tienen un origen fágico. Existen diferentes estudios que han cuantificado la presencia de bacteriófagos atemperados en aislados clínicos de neumococo. Los más recientes, indican que entre un 50% (Romero *et al.*, 2009b) y un 76% (Ramírez *et al.*, 1999) de los aislados contienen profagos (tanto viables como defectivos). Los métodos empleados para la detección de los mismos consisten en la inducción del fago con mitomicina C y observación de la lisis (Bernheimer, 1977), y en la detección de la presencia del gen *lytA* fágico mediante la utilización de técnicas de hibridación del ADN de neumococo con una sonda de su gen *lytA* (Ramírez *et al.*, 1999) o amplificación del mismo mediante PCR (Romero *et al.*, 2009b). Uno de los intereses del estudio de los bacteriófagos radica en que éstos podrían estar contribuyendo a la diversificación de la arquitectura genómica de la bacteria (Brüssow *et al.*, 2004; Buckling y Brockhurst, 2012; Lang *et al.*, 2012). En neumococo, concretamente, se han descrito posibles recombinaciones entre los genes *lytA* fágico y bacteriano (Romero *et al.*, 1990; Whatmore y Dowson, 1999; apartado IV.1 de esta Tesis) que podrían tener un papel importante en la virulencia de este patógeno (Loeffler y Fischetti, 2006; Boyd, 2012; Boyd *et al.*, 2012). Las enzimas líticas que codifican poseen además un importante potencial terapéutico como enzibióticos (Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2010; Nelson *et al.*, 2012; Schmelcher *et al.*, 2012). Por estas razones se decidió estudiar la presencia de profagos y tipificarlos (mediante su gen *lytA*) en los 164 aislados clínicos de neumococo previamente descritos. Asimismo, el disponer de un mayor número de secuencias del gen *lytA* fágico podría contribuir a un mejor entendimiento del origen evolutivo de dicho gen.

RESULTADOS

Tabla 15. Detección y tipificación de fagos atemperados en 164 aislados clínicos de *S. pneumoniae*

Serotipo ^a	ST ^b	PCR fago ^c	Inducción con mitomicina C ^d	PCR gen <i>lytA</i> fágico ^e	Alelo gen <i>lytA</i> fágico ^f
1 [56]	304 [10]	– [10]	NR	2/4	22_PPH [1/4]
	306 [46]	– [46]	NR	0/4	
3 [56]	180 [27]	– [7]	NR	3/3	4_PPH [1/3], 22_PPH [1/3]
		+ [20]	+ [7], – [13]	10/10	4_PPH [8/10]
	260 [26]	– [25]	NR	0/4	
		+ [1]	+ [1]	1/1	4_PPH [1/1]
	717 [1]	+ [1]	+ [1]	1/1	22_PPH [1/1]
	1220 [1]	– [1]	NR	0/1	
19A [54]	2314 [1]	+ [1]	+ [1]	1/1	4_PPH [1/1]
	63 [4]	+ [4]	+ [4]	4/4	21_PPH [1/4], 27_PPH [1/4], 29_PPH [1/4], ND [1]
	81 [9]	+ [9]	+ [5], – [4]	3/4	ND
	202 [6]	+ [6]	+ [4], – [2]	4/4	20_PPH [4/4]
	276 [5]	+ [5]	+ [2], – [3]	1/2	28_PPH [1/2]
	320 [5]	+ [5]	+ [5]	2/3	20_PPH [1/3]
	344 [1]	+ [1]	NR	NR	
	433 [3]	+ [3]	+ [3]	2/2	24_PPH [1/2], 30_PPH [1/2]
	450 [1]	+ [1]	+ [1]	NR	
	1201 [8]	– [1]	+ [1]	NR	
		+ [7]	+ [4], – [3]	4/4	23_PPH [1/4], 25_PPH [1/4], 26_PPH [1/4]
	2013 [8]	+ [8]	+ [4], – [4]	2/2	7_PPH [1/2]
	2110 [1]	+ [1]	+ [1]	NR	
	3995 [1]	+ [1]	+ [1]	1/1	20_PPH [1/1]
	4000 [1]	+ [1]	+ [1]	1/1	ND
	4010 [1]	+ [1]	+ [1]	NR	

^a [], número de aislados con dicho serotipo.

^b ST, secuencitipo; [], número de aislados con dicho ST.

^c +, PCR con cebadores P9 y P9-R positiva; –, PCR con cebadores P9 y P9-R negativa; [] número de aislados.

^d NR, inducción con mitomicina C no realizada; +, lisis; –, no lisis; [], número de aislados.

^e PCR realizada con los cebadores específicos para el gen *lytA*_{PPH}. Las fracciones indican el número de aislados que han dado positivo en la PCR respecto del número de aislados cuyo alelo *lytA*_{PPH} ha sido analizado.

^f Indica el alelo *lytA*_{PPH} que presentan los profagos encontrados; [], indica el número de aislados que poseen dicho alelo fágico respecto del número de aislados cuyo *lytA* fágico ha sido analizado. ND, secuencia del alelo *lytA*_{PPH} no determinada.

3.1. Detección y tipificación de fagos atemperados en aislados clínicos

Para la detección de fagos atemperados en los aislados clínicos de neumococo se empleó el sistema descrito previamente por Romero y cols. (2009b). La detección del profago se llevó a cabo mediante PCR utilizando la pareja de cebadores P9 y P9-R (véase Tabla 12 en Materiales y Métodos), los cuales hibridan con una región del gen de la holina (presente en todos los fagos atemperados), lo que conlleva la amplificación de un fragmento de 191 pb. Por medio de esta técnica, se detectó que el 46% (76/164) de los aislados analizados presentaban algún profago (o parte de él) (Tabla 15). En ninguno de los 56 aislados pertenecientes al serotipo 1 (10 del ST304 y 46 del ST306) se halló profago alguno. Sin embargo, de los 56 aislados correspondientes al serotipo 3 (27 del ST180, 26 del ST260, 1 del ST717, 1 del ST1220 y 1 del ST2314), un 41% presentaban al menos un fago atemperado, debido mayoritariamente a que el 74% de las cepas del ST180 contenían algún profago, mientras que sólo el 4% con ST260 lo hacía. En el caso de los aislados del promiscuo serotipo 19A (correspondientes a 14 STs diferentes), el 98% (53/54) de las cepas estudiadas eran lisogénicas.

En aquellos aislados en los que se detectó algún fago atemperado por PCR se realizaron ensayos de inducción de dichos fagos con mitomicina C. Se incluyó también la cepa 9324 (serotipo 19A/ST1201) la cual, a pesar de no presentar amplificación, se lisó en presencia de mitomicina C en un experimento anterior. El 61% (46/76) de estos aislados clínicos presentaron profagos que fueron capaces de entrar en ciclo lítico, aunque ello no implicaba necesariamente un ensamblado correcto de éstos.

El siguiente paso en el estudio consistió en intentar caracterizar los fagos por medio del gen *lytA_{PPH}* ya que presentaba propiedades distintivas en la mayoría de los fagos de neumococo descritos hasta ese momento (Tabla 13). Para ello, se diseñaron tres cebadores (Fag 3, Fag 4 y Fag 5) comunes para todos los alelos *lytA_{PPH}* descritos en esta Tesis con los que poder amplificar universalmente y secuenciar, *a priori*, el gen lítico de cualquier profago de *S. pneumoniae* (Fig. 12).

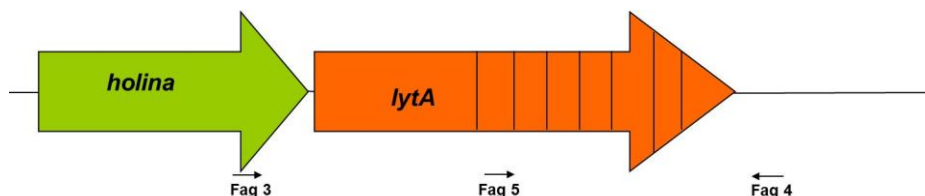


Fig. 12. Representación de la región donde se localiza los genes de la holina y de *lytA_{PPH}* dentro del módulo de lisis de los bacteriófagos atemperados. Las flechas negras indican el lugar donde hibridan los cebadores Fag 3, Fag 4 y Fag 5. La zona rayada del gen *lytA* indica, aproximadamente, el dominio de unión a colina de la enzima lítica.

De los 164 aislados clínicos se seleccionó un grupo de cepas representativas de cada serotipo que abarcara la mayoría de los STs disponibles, independientemente de su resultado en la prueba de detección de profago por PCR. Este grupo de aislados (56 cepas en total; 16 negativas en la PCR de detección de fago y 40 positivas), fue sometido a la prueba de PCR con los cebadores Fag 3 y Fag 4. Se observó amplificación del gen *lytA_{PPH}* en el 75% de los aislados (42 de los 56 casos), con sólo un 31% (5/16) en las cepas con resultado negativo en la detección de fago por PCR, pero un 92% (37/40) en las cepas con resultado positivo. Por otra parte, el 72% (29/40) de las cepas positivas en la PCR de detección de fago se lisó en presencia de mitomicina C y, de éstas, en el 96% (28/29) se amplificó el gen *lytA_{PPH}*. De las 11 cepas que no se lisaron en presencia de mitomicina C, un 28% (9/11) también presentaban este gen.

De las 42 cepas en las que se obtuvo amplicón en la PCR de *lytA_{PPH}*, el 71% (30/42) se pudo secuenciar; en el 29% restante no se pudo obtener una buena secuencia del gen completo. Todos los alelos secuenciados tenían un tamaño de 957 pb, de los que 10 no habían sido descritos hasta ese momento (*lytA_{20_PPH}*–*lytA_{29_PPH}*) (Tabla 16).

Tabla 16. Alelos del gen *lytA* de tipo fágico presentes en las BD y encontrados en esta Tesis

Alelo <i>lytA</i> _{PPH}	Fago	Alelo <i>lytA</i> _{Spn} ^b	Serotipo/ ST ^c	Referencia
1	HB3	ND	ND	Romero <i>et al.</i> , 1990
2	MM1	13	23F/81	Obregón <i>et al.</i> , 2003a
	MM1-1998	ND	24/ND	Loeffler y Fischetti, 2006
	MM1-2008	13	23F/81	Romero <i>et al.</i> , 2009a
3	VO1	4	19A/1656	Obregón <i>et al.</i> , 2003b
4	φSpn_OXC	4	3/180	Romero <i>et al.</i> , 2009a
	φSpn_3	4	3/180	Romero <i>et al.</i> , 2009a
	Otros fagos atemperados ^a			
	φ3003, φ4066, φ5410, φ5814, φ6316, φ6411, φ6549, φ7312, φ8057, φ8150, φ8564	17	3/180, 3/260, 3/2314	Esta Tesis
5	φSpn_H_1	22	19A/268	Romero <i>et al.</i> , 2009a
6	φSpn_195_1	19	9V/156	Romero <i>et al.</i> , 2009a
7	φSpn_195_2	19	9V/156	Romero <i>et al.</i> , 2009a
	φ9085 ^a	21	19A/2013	Esta Tesis
8	φSpn_1873	2	6A/376	Romero <i>et al.</i> , 2009a
	SV1	ND	23F	Frias <i>et al.</i> , 2009
9	φSpn_11	20	11D/62	Romero <i>et al.</i> , 2009a
10	φSpn_3059	2	19A/199	Romero <i>et al.</i> , 2009a
11	φSpn_19	19	19F/485	Romero <i>et al.</i> , 2009a
12	φSpn_6	2	6A/460	Romero <i>et al.</i> , 2009a
13	φSpn_23	23	23F/37	Romero <i>et al.</i> , 2009a
14	φSpn_14	21	14/124	Romero <i>et al.</i> , 2009a
15	φSpn_670_1	5	6B/90	No publicado
16	φSpn_670_2	5	6B/90	No publicado
17	φSpn_JJA	2	14/66	No publicado
18	φSpn_1031	24	1/303	No publicado
19	φSpn_70585	25	5/289	No publicado
20	φ625 ^a , φ3694 ^a , φ5610 ^a , φ5986 ^a , φ6355 ^a , φ7191 ^a , φ9157 ^a	27, 13, 27, 27, 27, 27, 13	19A/202, 19A/3995, 19A/63, 19A/320	Esta Tesis
21	φ7796 ^a	22	19A/66	Esta Tesis
22	φ6993 ^a , φ8205 ^a , φ8295 ^a	6, 19, 13	1/304, 3/180, 3/717	Esta Tesis
23	φ8027 ^a	19	19A/1201	Esta Tesis
24	φ7167 ^a	10	19A/433	Esta Tesis
25	φ8413 ^a	19	19A/1201	Esta Tesis
26	φ5071 ^a	19	19A/1201	Esta Tesis
27	φ7904 ^a	21	19A/276	Esta Tesis
28	φ5845 ^a	22	19A/63	Esta Tesis
29	φ7466 ^a	10		Esta Tesis

^a La numeración asignada al fago se corresponde con el de la cepa de la que proviene.^b Alelo del gen *lytA* de la cepa hospedadora. ND, no disponible en las BD.^c Serotipo y ST de la cepa hospedadora. ND, no disponible en las BD.

Aunque los alelos fágicos en los serotipos más representados mostraron un elevado grado de redundancia, ésta no era total. De los 13 genes *lytA*_{PPH} secuenciados de aislados con serotipo 3, 11 correspondían al alelo 4_PPH y 2 al 22_PPH. En concreto, de los 10 aislados de serotipo 3 con ST180, 9 pertenecían al alelo 4_PPH y 1 al 22_PPH, por lo que existía diversidad incluso dentro de un mismo ST. Los 15 genes secuenciados de cepas con serotipo 19A, correspondían hasta a 10 alelos distintos, en línea con la elevada promiscuidad genómica de este serotipo.

3.2. Comparación de cepas por secuencitipo, serotipo y presencia de alelos *lytA*_{PPH}

Romero y colaboradores (2009b) describieron que, aislados pertenecientes al mismo secuencitipo mostraban distinto contenido en fagos. Por ello, el contenido y grupo de fagos se complementó con el alelo *lytA*_{PPH}. Para ello, se tipificaron 56 aislados clínicos por medio de su alelo *lytA*_{PPH} (Tabla 15) y se construyó el árbol filogenético correspondiente a la concatenación de sus alelos MLST (Fig. 13). Salvo en el nodo que agrupaba los secuencitipos ST202, ST320 y ST3995, en el resto de nodos, se observó variabilidad en cuanto al contenido de alelo *lytA*_{PPH}, e incluso, variabilidad en la presencia/ausencia del gen (por ejemplo, el nodo que agrupa ST304 y ST306).

3.3. Similitudes entre *lytA*_{PPH} y *lytA*_{Spn}

Hasta el momento, todos los fagos atemperados de neumococo que se habían descrito poseían un gen *lytA* muy similar (>80% de nt idénticos) al del hospedador (Romero *et al.*, 1990; Obregón *et al.*, 2003a, b; Romero *et al.*, 2009a) e incluso se habían observado posibles recombinaciones entre ellos (Romero *et al.*, 1990; Whatmore y Dowson, 1999). Teniendo en cuenta lo anterior y los datos de una posible recombinación entre genes *lytA* fágicos y bacterianos comentados en el apartado IV.1.2.3 de esta Tesis, se consideró interesante estudiar la similitud existente entre los alelos *lytA*_{PPH} y *lytA*_{Spn}, con el fin de avanzar en el entendimiento del origen evolutivo del gen *lytA* y la contribución de los bacteriófagos a la variabilidad alélica del mismo (Tabla 17). Se calcularon los valores PED existentes entre el alelo *lytA*_{PPH} de cada fago respecto del alelo *lytA*_{Spn} de su cepa hospedadora que mostraron distancias que variaban entre 7.76% y 18.68%. Asimismo, se calcularon los

PEDs de cada uno los alelos *lytA*_{PPH} respecto a todos los alelos *lytA*_{Spn}. Los alelos *lytA*_{PPH} más próximos a los alelos *lytA*_{Spn}, por orden de proximidad decreciente, fueron *lytA*_{15_PPH} (7.76%–9.52%), *lytA*_{22_PPH} (8.35%–9.90%), *lytA*_{14_PPH} (9.19%–9.80%), *lytA*_{10_PPH} (10.53%–11.66%) y *lytA*_{17_PPH} (11.03%–11.65%). Este hecho también se observó al construir un filograma basado en los alelos *lytA*_{PPH} y *lytA*_{Spn} (Fig. 14). En el caso de los alelos *lytA*_{9_PPH}, *lytA*_{10_PPH} y *lytA*_{15_PPH}, el alelo *lytA*_{Spn} más próximo a ellos corresponde al alelo de su cepa hospedadora. El alelo *lytA*_{10_Spn} es el más próximo a prácticamente todos los alelos *lytA*_{PPH}.

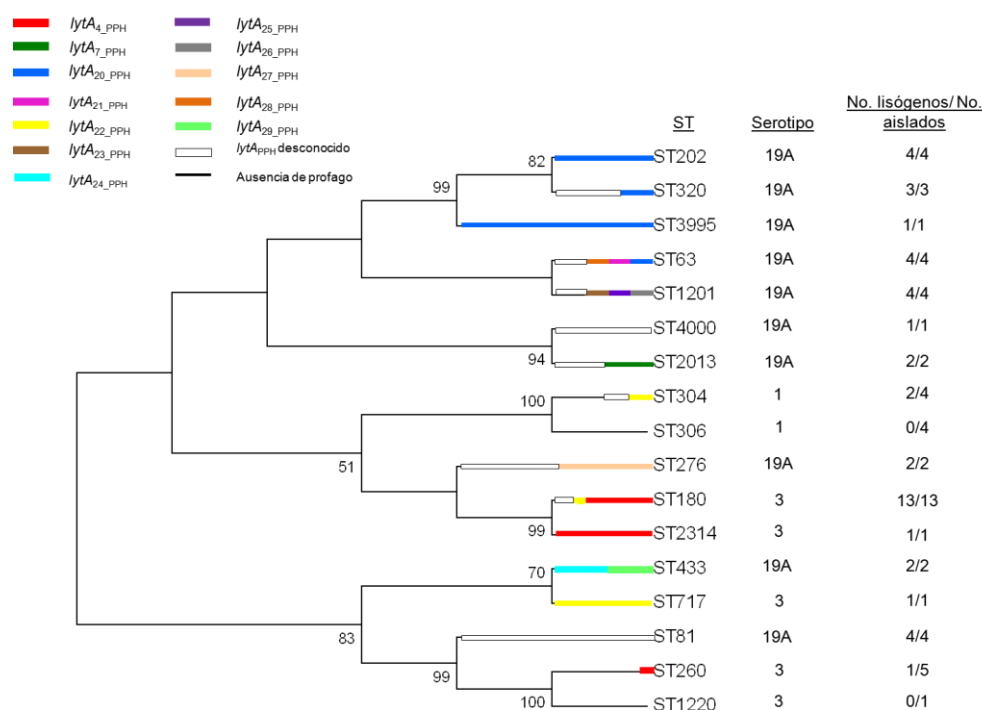


Fig. 13. Dendrograma construido a partir de los STs de 56 aislados clínicos de neumococo. Se indican los serotipos y el contenido de fagos atemperados (o restos fágicos) en dichos aislados. Las barras de colores indican proporcionalmente los alelos *lytA*_{PPH} encontrados en cada uno de los STs. La barra blanca corresponde a aquellos alelos cuya secuencia no se pudo determinar a pesar de haberse obtenido amplicón. Una línea horizontal (carente de barra) indica que no se ha podido detectar profago ni por PCR de detección de fago, ni por inducción con mitomicina C, ni con PCR de *lytA*_{PPH}.

RESULTADOS

Tabla 17. PEDs entre *lytA_{PPH}* y el gen *lytA_{Spn}*^a

Alelo <i>lytA_{PPH}</i>	PED _{min} -PED _{máx} (%) (<i>lytA_{Spn}</i>) ^a	PED (%) ^b (<i>lytA_{Spn}</i> cepa hospedadora)
1_PPH	12.87-14.58 (8_Spn-10_Spn)	
2_PPH	14.03-15.08 (20_Spn-10_Spn)	14.67 (13_Spn)
3_PPH	14.06-14.85 (20_Spn-10_Spn)	14.7 (24_Spn)
4_PPH	16.58-17.40 (19_Spn-10_Spn)	17.0 (17_Spn)
5_PPH	15.79-16.87 (20_Spn-10_Spn)	16.32 (22_Spn)
6_PPH	13.80-14.85 (20_Spn-10_Spn)	14.18 (19_Spn)
7_PPH	15.10-16.17 (20_Spn-10_Spn)	15.48 (19_Spn) 15.87 (21_Spn)
8_PPH	16.06-17.15 (20_Spn-10_Spn)	16.72 (2_Spn)
9_PPH	15.11-16.18 (20_Spn-10_Spn)	15.11 (20_Spn)
10_PPH	10.53-11.66 (2_Spn, 25_Spn-10_Spn)	10.53 (2_Spn)
11_PPH	15.91-16.61 (19_Spn-10_Spn)	15.91 (19_Spn)
12_PPH	15.38-16.45 (20_Spn-10_Spn)	15.78 (2_Spn)
13_PPH	18.52-19.25 (19_Spn-10_Spn)	18.68 (23_Spn)
14_PPH	9.19-9.80 (2_Spn, 5_Spn-10_Spn, 20_Spn)	9.3 (21_Spn)
15_PPH	7.76-9.52 (5_Spn-6_Spn)	7.76 (5_Spn)
16_PPH	16.14-17.23 (20_Spn-10_Spn)	16.56 (5_Spn)
17_PPH	11.03-11.65 (5_Spn, 25_Spn-10_Spn, 20_Spn)	11.26 (2_Spn)
18_PPH	13.90-15.35 (2_Spn, 25_Spn-10_Spn)	15.08 (24_Spn)
19_PPH	15.91-17.00 (20_Spn-10_Spn)	16.57 (25_Spn)
20_PPH	12.90-13.93 (20_Spn-10_Spn)	13.29 (13_Spn) 12.66 (20_Spn) 13.3 (27_Spn)
21_PPH	13.52-14.45 (20_Spn-10_Spn)	13.91 (22_Spn)
22_PPH	8.35-9.90 (2_Spn, 25_Spn-10_Spn)	8.57 (6_Spn) 9.53 (13_Spn) 9.29 (19_Spn)
23_PPH	15.76-16.84 (20_Spn-10_Spn)	16.14 (19_Spn)
24_PPH	16.45-17.15 (20_Spn-4_Spn, 10_Spn, 17_Spn, 24_Spn)	17.15 (10_Spn)
25_PPH	14.30-15.24 (20_Spn-10_Spn)	14.57 (19_Spn)
26_PPH	13.66-14.59 (20_Spn-10_Spn)	13.92 (19_Spn)
27_PPH	16.75-17.56 (20_Spn-4_Spn, 10_Spn, 17_Spn, 24_Spn)	17.28 (21_Spn)
28_PPH	14.43-15.48 (20_Spn-10_Spn)	14.94 (22_Spn)
29_PPH	12.66-13.69 (20_Spn-10_Spn)	13.69 (10_Spn)

^a Valor mínimo y máximo de PED de todos los alelos *lytA_{PPH}* respecto de todos los alelos *lytA_{Spn}* descritos en esta Tesis. Entre paréntesis se indican los alelos *lytA_{Spn}* a los que corresponden dichas PEDs mínima y máxima.

^b PEDs entre *lytA_{PPH}* y el gen *lytA_{Spn}* de su cepa hospedadora. Entre paréntesis se indica el alelo *lytA_{Spn}* de la cepa hospedadora correspondiente. Se desconoce el alelo *lytA_{Spn}* de la cepa hospedadora correspondiente al alelo 1_PPH.

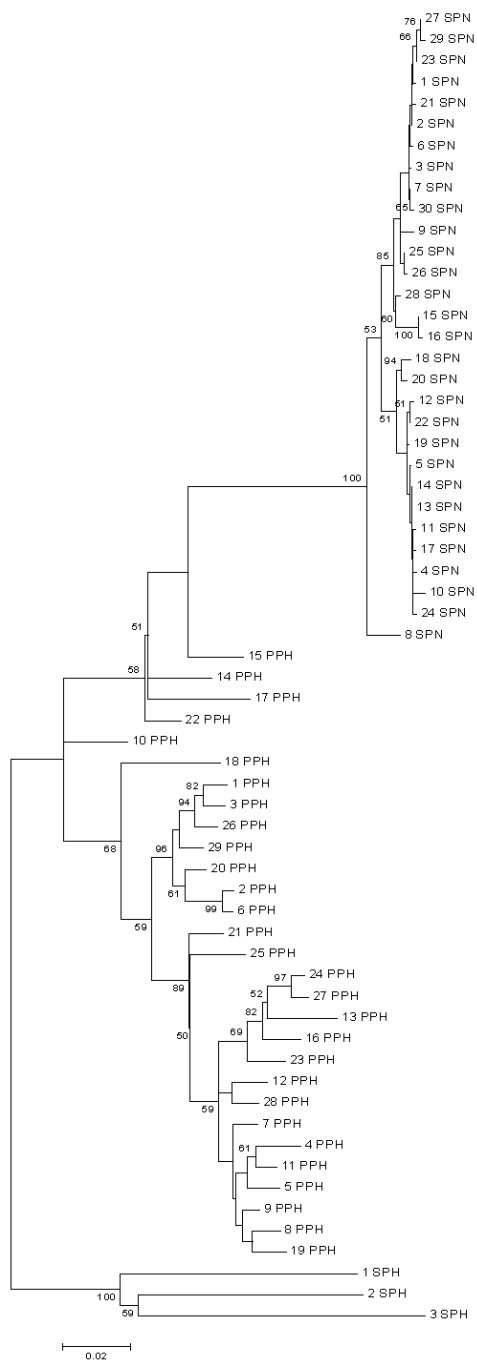


Fig. 14: Filograma correspondiente a todos los alelos *lytA*_{PPH}, *lytA*_{SPH} y *lytA*_{Spn} descritos en esta Tesis. La escala representa el número de mutaciones por nt.

Por otro lado, al igual que en el apartado 1 de este capítulo, se realizó un alineamiento múltiple de la región que rodea al nt 453 de todos los alelos *lytA_{Spn}* y *lytA_{PPH}* descritos en esta Tesis (Fig. 15). En el alineamiento mostrado en la Fig. 4 se ponía de manifiesto que únicamente la secuencia nucleotídica de los alelos *lytA_{15_PPH}* y *lytA_{2_SPH}* eran idénticas a la secuencia característica de la Fam_A y Fam_B, respectivamente. En este segundo alineamiento, donde se ha incorporado un mayor número de alelos *lytA_{Spn}* y *lytA_{PPH}*, se encontró un segundo alelo fágico (en este caso corresponde al de un fago de *S. pneumoniae*) que corresponde a la secuencia característica de la Fam_B, el alelo *lytA_{22_PPH}*. Este alelo fágico se encontró en cepas de *S. pneumoniae* cuyos alelos *lytA_{Spn}* correspondían a la Fam_A (*lytA_{13_Spn}*, cepa 8295) o a la Fam_B (*lytA_{6_Spn}*, cepa 6993; *lytA_{19_Spn}*, cepa 8205). Se realizó una comparación de la secuencia completa del alelo *lytA_{22_PPH}* con los alelos bacterianos de sus cepas hospedadoras (*lytA_{6_Spn}*, *lytA_{13_Spn}* y *lytA_{19_Spn}*) y con los alelos *lytA_{Spn}* a los cuales se encuentra más próximo (2_*Spn* y 25_*Spn*, ambos pertenecientes a la Fam_B). Dicha comparación puso de manifiesto una posible recombinación entre el gen fágico y el bacteriano; más concretamente, se vio que el alelo *lytA_{22_PPH}* era idéntico al alelo *lytA_{25_Spn}* entre las posiciones 180 y 485. A continuación, se realizó una comparación de la secuencia completa del alelo *lytA_{22_PPH}* con los alelos *lytA* fágicos encontrados en otras cepas portadoras de los mismos alelos *lytA_{Spn}* que sus cepas hospedadoras; esto es, con los alelos *lytA* fágicos encontrados en cepas con el alelo *lytA_{13_Spn}* (*lytA_{2_PPH}* y *lytA_{20_PPH}*) y *lytA_{19_Spn}* (*lytA_{6_PPH}*, *lytA_{7_PPH}*, *lytA_{11_PPH}*, *lytA_{23_PPH}*, *lytA_{25_PPH}* y *lytA_{26_PPH}*); en el alelo *lytA_{6_Spn}*, sólo se ha encontrado el alelo *lytA_{22_PPH}* (Tabla 17). Se vio que el alelo *lytA_{26_PPH}* presentaba únicamente un nt diferente en la región 1–179 (posición 177) y otro en la región 486–957 (posición 519). En la comparación del alelo *lytA_{22_PPH}* con los alelos que presentaban regiones de un tamaño considerable y prácticamente idénticas (los alelos *lytA_{26_PPH}* y *lytA_{25_Spn}*), se observó que, muy probablemente, se había producido una recombinación entre los alelos *lytA_{26_PPH}* y *lytA_{25_Spn}* dando lugar al alelo *lytA_{22_PPH}* (Fig. 16).

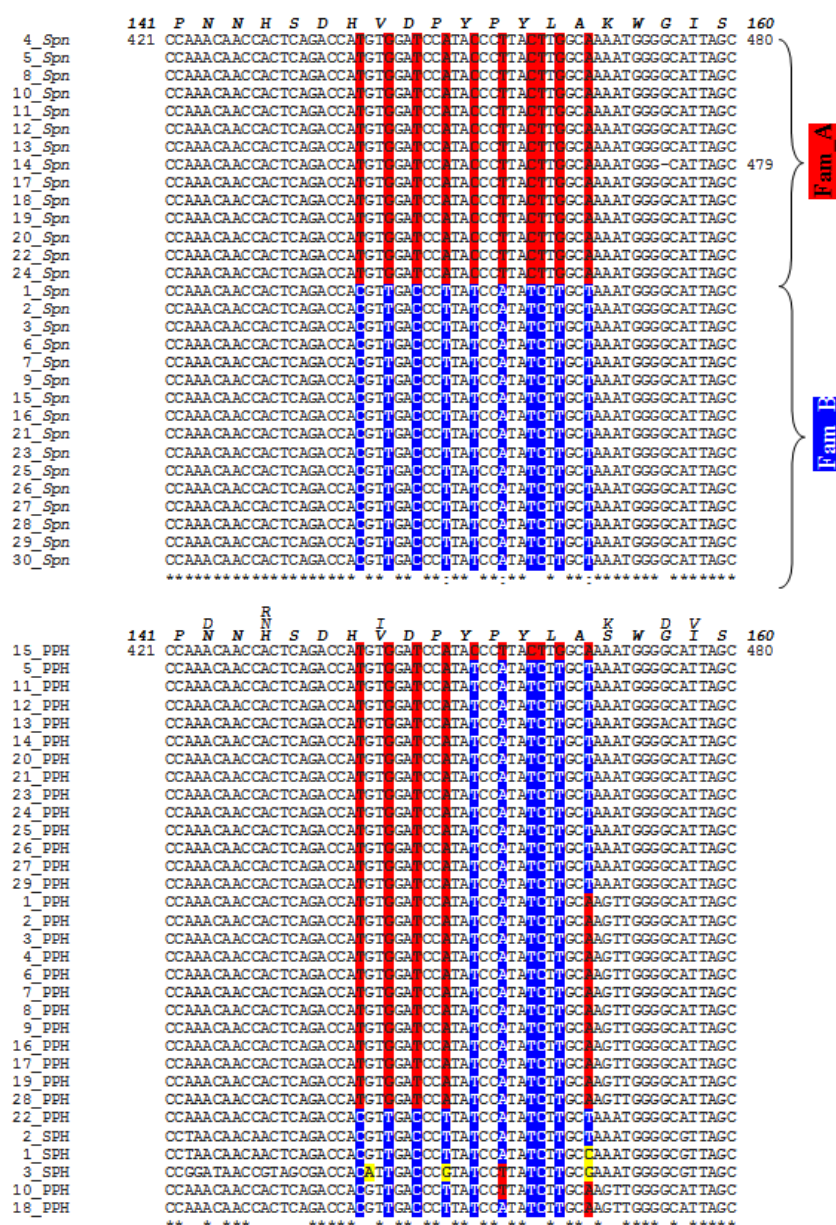


Fig. 15. Alineamiento múltiple de los alelos *lytA_{Spn}* y *lytA_{PPH}*. En rojo y azul se encuentran resalta- dos, respectivamente, los nt característicos de la Fam_A y Fam_B. Los asteriscos indican los nt idénticos en todas las secuencias. En la secuencia *lytA_{14_Spn}*, el guión corresponde a la delección real de un nt (cepa S3). Se muestran las posiciones de nt y aa (se toma como posición 1 el primer nt del codón de inicio ATG o el primer residuo de la proteína). También se indican los polimorfis- mos de la secuencia de aa.

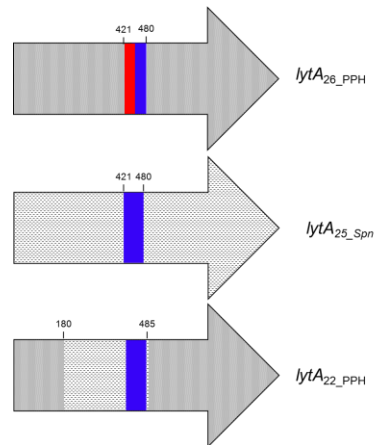


Fig. 16. Representación de la posible recombinación entre el alelo *lytA*_{26_PPH} y *lytA*_{25_Spn} que pudo dar lugar al alelo *lytA*_{22_PPH}. En rojo se muestra la región de nt característica de la Fam_A y, en azul, la correspondiente a la Fam_B. Los números indican las posiciones de los nt.

4. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD DE LAS NAM-AMIDASAS LYTA DE *S. PNEUMONIAE* Y OTROS SMG

Como ya se ha comentado en la Introducción de esta Tesis, aunque *lytA* se ha considerado clásicamente como un gen específico de *S. pneumoniae*, en los últimos años se ha observado que ciertos SMG (*S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* y otros estreptococos no bien clasificados) también poseen el gen *lytA* (con, aproximadamente, un 80% de identidad con respecto a los alelos neumocócicos) con características especiales tanto en su secuencia de nucleótidos como en la respuesta de la enzima que codifican frente a Doc (Obregón *et al.*, 2002; Balsalobre *et al.*, 2006; Llull *et al.*, 2006). Esto mismo se ha observado para el caso de las enzimas líticas presentes en los profagos de *S. mitis* (cepas 101/87, B6 y HER) (Díaz *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 2004a). En este comportamiento dispar se basa la prueba del Doc que se realiza en los laboratorios clínicos de referencia para diferenciar entre un neumococo y otro SMG. El tamaño de estos genes es de 957 pb (*lytA*_{Spn}, *lytA*_{PPH} y algunos *lytA*_{SPH}) o de 951 pb (*lytA*_{SMG} y algunos *lytA*_{SPH}). En general, todas las *LytA* no neu-

mocócicas presentaban una menor actividad específica que la de los alelos *LytA_{Spn}* genuinos (Díaz *et al.*, 1992; Obregón *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004a). Debido a que en los últimos años el número de genomas bacterianos secuenciados se ha incrementado muy notablemente, nos propusimos investigar si las estirpes de SMG secuenciadas recientemente portaban algún gen *lytA* con una secuencia nucleotídica novedosa. Para ello, se realizó una búsqueda en las BD por medio de la herramienta BLAST (la última búsqueda se realizó en diciembre de 2012). Como resultado de la búsqueda se hallaron una serie de SMG que poseían genes *lytA* con características peculiares (Tabla 18). Se encontró que cepas de *S. infantis*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. pseudopneumoniae* portaban genes *lytA* con tamaño y/o secuencia diferentes a los descritos hasta ese momento.

Tabla 18. Estirpes de SMG recientemente secuenciadas que poseen genes *lytA* peculiares

Estirpe	Origen	Tamaño en nt (aa)	Alelo <i>lytA</i> ^c
<i>S. infantis</i> SK970 (CCUG 36756)	Fágico	945 (314)	Nuevo
<i>S. mitis</i>			
Biovar 2	Fágico	945 (314)	Nuevo
SK564	Bacteriano	951 (316) ^a	Nuevo
SK597 (CCUG 55094)	Bacteriano	951 (316)	Nuevo
SK1073	Fágico	945 (314)	Nuevo
SK1080	Bacteriano	951 (316)	Nuevo
<i>S. oralis</i>			
SK313	Fágico	966 (321) ^b	Nuevo
ATCC 49296 ^d	Fágico	966 (321)	Nuevo
	Fágico	957 (318)	Nuevo
<i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493	Fágico	957 (318)	Nuevo
	Bacteriano	951 (316)	18_SMG

^a Posee el mismo alelo *LytA* que la cepa *S. mitis* SK597.

^b En las BD, esta proteína está descrita como poseyendo 336 aa; se ha vuelto a secuenciar el gen correspondiente y se ha visto que estaba mal secuenciado y que, en realidad, codifica una proteína de 321 aa.

^c Nuevo, alelo no descrito en las BD ni previamente en esta Tesis.

^d Véase nota b de la Tabla 8 en Materiales y Métodos.

Con el fin de determinar las enzimas cuyo estudio funcional podría proporcionar más información sobre la actividad de la familia, se construyó un árbol filogenético de estos alelos junto con todos los alelos LytA_{SPN} , LytA_{SMG} , LytA_{SPH} y LytA_{PPH} descritos a lo largo de esta Tesis (Fig. 17). A la vista del filograma, se consideraron de interés las siguientes enzimas: 1) las NAM-amidasas LytA de *S. pseudopneumoniae* IS7493, por tratarse una de ellas de una enzima de tipo fágico —hecho que no había sido descrito anteriormente en esta especie— y por ser relativamente diferente al resto de alelos LytA fágicos en cuanto a su secuencia; 2) las dos LytAs fágicas de *S. oralis* (cepas SK313 y ATCC 49296), las de *S. mitis* (biovar 2 y SK1073) y la de *S. infantis* SK970 —por tratarse de unas enzimas muy diferentes a cualquiera de las ya descritas— y 3) la de *S. mitis* SK597, por tratarse de una cepa híbrida entre *S. mitis* y *S. oralis* (Kilian *et al.*, 2008). El análisis de las secuencias del gen *lytA* de estas estirpes así como la caracterización de las proteínas que codifican, permitió profundizar aún más en el estudio del origen evolutivo de este factor de virulencia así como en el de las relaciones filogenéticas entre los SMG.

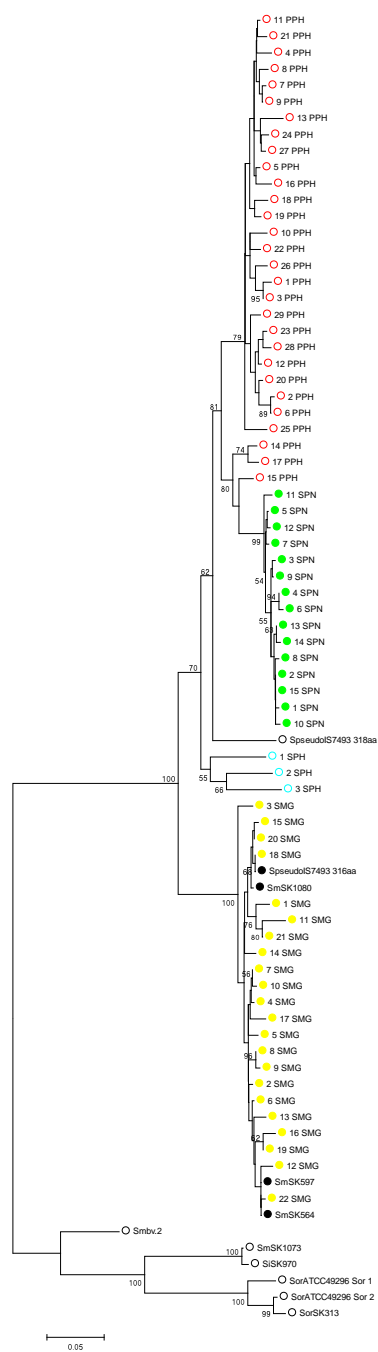


Fig. 17. Árbol filogenético construido con los alelos *LytA* descritos previamente en esta Tesis (*LytA_{SPN}*, *LytA_{SMG}*, *LytA_{PPH}*, *LytA_{Sph}*) y los nuevos encontrados en las BD. Los círculos vacíos corresponden a alelos de tipo fágico y los llenos a los bacterianos. En verde, amarillo, rojo, azul y negro se muestran, respectivamente, los *cluster* *LytA_{SPN}*, *LytA_{SMG}*, *LytA_{PPH}*, *LytA_{Sph}* y los alelos nuevos encontrados.

4.1. Genes *lytA* de nuevos SMG

El estudio se restringió a aquellas cepas a las que se pudo tener acceso: *S. infantis* SK970, *S. mitis* SK597, *S. mitis* SK1073, *S. oralis* SK313 y *S. oralis* ATCC 49296.

Antes de proceder al estudio de estas cepas, se secuenciaron sus genes *lytA* para confirmar las secuencias publicadas. Con dicho fin, se diseñaron una serie de cebadores específicos para cada estirpe, de tal manera, que pudieran ser empleados también para su posterior clonación en plásmidos de expresión (Tablas 11 y 12 en Materiales y Métodos). Se pudieron confirmar así las secuencias del gen *lytA* publicadas de todas las estirpes excepto en el caso de *S. oralis* SK313. El gen *lytA*_{SK313} publicado, presenta un tamaño de 1011 pb cuando, en realidad, este gen posee un tamaño de 966 pb ya que, entre las posiciones 959–963 hay 5 adeninas en vez de 4 (como está publicado), lo que produce un cambio de fase y la aparición de un codón de terminación. También se advirtió que el alelo *LytA*_{SK597} únicamente se diferencia en un aminoácido (V168I) de *LytA*_{22-SMG}. Seguidamente, se realizó una comparación de los nuevos alelos *LytA* de los SMG estudiados en este apartado frente a los *LytA*_{SMG}, *LytA*_{PPH} y *LytA*_{SPH} ya descritos anteriormente (Tabla 19 y Figs. 18 y 19). A la vista de los datos de PEDs resulta muy notable el hecho de que las nuevas NAM-amidasas *LytA* son muy diferentes de las anteriormente conocidas, mostrando sus genes unos valores PED entre 45 y 50%. Además, se observó que estos nuevos alelos de SMG (excepto *LytA*_{SK597}) eran mucho más parecidos entre sí que cualquiera de los alelos *LytA*_{SMG}, *LytA*_{PPH} o *LytA*_{SPH}. Igualmente, estos alelos nuevos se encuentran ligeramente más próximos a los alelos *LytA*_{SMG} y *LytA*_{PPH} que a los *LytA*_{SPH} (hay que tener en cuenta que con anterioridad a estos datos sólo se disponía de tres alelos *LytA*_{SPH}; Tabla 13). Se observó que *LytA*_{SK970} y *LytA*_{SK1073} son dos alelos muy parecidos (PED = 0.96%), diferenciándose únicamente en 3 aa. Por otra parte, el alelo que más se parece a *LytA*_{SK313} es *LytA*_{Sor_2} (*LytA* de 321 aa de *S. oralis* ATCC 49296) (PED = 1.26%), diferenciándose en 4 aa. El alelo *LytA*_{Sor_1} (*LytA* de 318 aa de *S. oralis* ATCC 49296) se encuentra más próximo a los alelos *LytA*_{SK313} y *LytA*_{Sor_2} (PED de 5.55 y 5.22, respectivamente) que al resto.

Al analizar las secuencias de las NAM-amidasas *LytA* de los SMG estudiados en este apartado de la Tesis (Figs. 18 y 19), se observó que *LytA*_{SK970} y *LytA*_{SK1073} presentaban los cambios V309I (conservativo) y V317T (no conservativo), ambos implicados en la formación del homodímero de C-*LytA* (Fernández-Tornero *et al.*, 2001, 2002; Romero *et al.*, 2007). Los alelos *LytA*_{SK313} y *LytA*_{Sor_2} presentaban únicamente el cambio no conservativo V309T. El alelo *LytA*_{Sor_1} muestra los cambios

V309T e I315V (conservativo). Además de estas mutaciones en los aa implicados en la dimerización, los alelos $\text{LytA}_{\text{SK313}}$, $\text{LytA}_{\text{SK970}}$, $\text{LytA}_{\text{SK1073}}$, $\text{LytA}_{\text{Sor}_1}$ y $\text{LytA}_{\text{Sor}_2}$ presentaban varias deleciones a lo largo de la proteína con respecto a los alelos LytA_{PPH} y LytA_{SPH} . Los cinco alelos presentaban deleciones en las posiciones 173 y 224 y en los dos aa T290-G291, esta última, característica de los alelos LytA_{SMG} y de algunos LytA_{SPH} (Díaz *et al.*, 1992; Obregón *et al.*, 2002) ya comentada. Todas las deleciones afectaban a residuos del CBD. En el caso del alelo $\text{LytA}_{\text{SK597}}$, no existen cambios en los residuos implicados en la dimerización pero, al igual que el resto de alelos LytA_{SMG} , presenta la deleción T290-G291.

Tabla 19. Comparación de las secuencias de aa de los alelos LytA_{SMG} , LytA_{PPH} , LytA_{SPH} y los de otros SMG analizados en esta Tesis^a

Alelos LytA	SK970	SK1073	Sor_2	SK313	Sor_1	SMG ^b	PPH ^c	SPH ^d
SK970	0	0.96	22.54	21.69	22.97	44.69–46.98	44.69–49.33	47.39–53.00
SK1073	99	0	22.97	22.11	23.41	44.33–46.98	44.69–49.33	47.39–53.00
Sor_2	81	81	0	1.26	5.22	45.82–48.74	45.82–49.33	49.17–53.00
SK313	81	81	99	0	5.55	46.98–49.93	46.40–49.93	49.77–54.89
Sor_1	81	80	95	95	0	46.40–49.33	45.82–49.33	49.17–54.89
SMG						0.32–6.62	13.51–19.86	12.81–20.69
PPH							0.63–8.32	10.47–15.34
SPH								9.03–11.27

^a SK970, *S. infantis* SK970 (314 aa); SK1073, *S. mitis* SK1073 (314 aa); Sor_2 , *S. oralis* ATCC 49296 (321 aa); SK313, *S. oralis* SK313 (321 aa); Sor_1 , *S. oralis* ATCC 49296 (318 aa); SMG, alelos LytA_{SMG} ; PPH, alelos LytA_{PPH} ; SPH, alelos LytA_{SPH} . Sobre la diagonal de ceros, PED (en %) entre los diferentes alelos LytA ; bajo la diagonal, porcentaje de aa idénticos entre los diferentes alelos LytA .

^{b, c, d} Valor mínimo y máximo de PED respecto a todos los alelos LytA_{SMG} , LytA_{PPH} y LytA_{SPH} descritos hasta este momento, respectivamente.

RESULTADOS

		1	2	3	4	5	6	7
		0	0	0	0	0	0	0
Alelo								
LytA ₁₁ PPH	MDIDRNRLRTGLPQVGVPYRQVHAHSTGNRNSTVQNEADYHYRKDPGLGFFSHVVGNGRVMQVGPVNNG							
	TS A W SF I							
LytA _{SK970}	*E**KS***N**I*E*****P***A*****M*RPV*S*****NG*IL*TWL*DR*							
LytA _{SK1073}	*EV*KS***N**I*E*****P***A*****L*RPV*S*****NG*I**TWL*DR*							
LytA _{SK313}	****TS***D**I*E*****I*****P***A*****M*RPVDS*****NG*V**TWYTD*							
LytA _{Sor 2}	****TS***D**I*E*****I*****P***A*****M*RPVDS*****NG*V**TWYTD*							
LytA _{Sor 1}	****TS***D**I*E*****I*****P***A*****M*RPVDS*****NS*V**TWYTD*							
		7	8	9	1	1	1	1
		1	0	0	0	0	0	0
LytA ₁₁ PPH	SWDVGGWNTESYAAVELIESHSTKEEFMTDYRLYIELLRNLADEAGLPKTLTDDLAGIKTHEYCTNNQ							
	A A T A GS							
LytA _{SK970}	AY*****V*G**Q*****ES*****R*****VK***E*****I*****SSS*****QF**Y**							
LytA _{SK1073}	AY*****V*G**Q*****ES*****R*****VK***E*****I*****SSS*****QF**Y**							
LytA _{SK313}	AY*****V*G*GQ*****A*****R**K**V*****I*****SDS*****Q***Y**							
LytA _{Sor 2}	AY*****V*G*GQ*****A*****R**K**V*****I*****SDS*****Q***Y**							
LytA _{Sor 1}	AY*****V*G*GQ*****E*****R**K**V*****I*****SDS*****Q***Y**							
		1	1	1	1	1	2	2
		4	5	6	7	8	9	1
		1	0	0	0	0	0	0
LytA ₁₁ PPH	PNNHSDHVDPPYLAKWGISREQFKQDIENGLSAAATGWQKNGTGYYVHSDGSYPKDKFEKINGTWYFFD							
	S D H TIE D F S							
LytA _{SK970}	***G*****K*G*****K***S**--TEGN*KR*EV*W*WEEA**S**KSQWKN*K*E*F***							
LytA _{SK1073}	***G*****K*G*****K***S**--TEGN*KR*EV*W*WEEA**S**KSQWKN*K*E*F***							
LytA _{SK313}	*R*S*****KWG*****K***G**--SEA**RQ*AS*W*WEE**S**TKTWKQ*K*E*F**N							
LytA _{Sor 2}	*R*Y*****K*G*****K***G**--SEA**RQ*AS*W*WEE**S**TKTWKQ*K*E*F**N							
LytA _{Sor 1}	*R*Y*****K*G*****K***G**--SEAS*KQ*G*W*WEE**S**TNRWKQ*NE*FR**							
		2	2	2	2	2	2	2
		1	2	3	4	5	6	7
		1	0	0	0	0	0	0
LytA ₁₁ PPH	GSGYMLADRWKKHTDGNWYFDQSGEMATGWKKIADKWYFDVEGAMKTGWVKYKDTWYLLDAKEGAMVS							
	S S R Y W N Q E NE D							
LytA _{SK970}	NR**CFINK*FND-GKD*FYL*KR*A*V***MH*DHR***KSD*R*AKG****RE*****E*D*D*K*							
LytA _{SK1073}	NR**CFINK*FND-GKD*FYL*KR*A*V***MH*DHR***KSD*R*AKG****RE*****E*D*D*K*							
LytA _{SK313}	ER**C*IN**FND-GKD*FYL*KR*A*V***MFLNHR**F*KSD*R*A*G****RE***FMEE*D*Y*L*							
LytA _{Sor 2}	ER**C*IN**FND-GKD*FYL*KR*A*V***MFLNHR**F*KSD*R*A*G****RE***FMEE*D*Y*L*							
LytA _{Sor 1}	ER**C*IN**FND-GKD*FYL*KR*A*V***MFLNHR**F*KSD*R*A*G****RE***FMEE*D*Y*L*							
		2	2	3	3	3		
		8	9	0	1	2		
		1	0	0	0	5		
LytA ₁₁ PPH	NAFIQSADGTGWYLLKPDGTLADKPEFTVEPDGLITVK							
	T A I SM D D							
LytA _{SK970}	KQ**KSGN*---**L*S**SLSV**E**I***G***TN							
LytA _{SK1073}	KQ**KSGN*---**L*S**SLSV**E**I***G***TN							
LytA _{SK313}	KQ**KSG*---**L*AN*ELHTD*A*KT***G****VDKPKEEK							
LytA _{Sor 2}	KQ**KSG*---**L*AN*ELHTD*A*KT***G****VDKPKEEK							
LytA _{Sor 1}	KQ**KSG*---**L*AN*ELHTD*A*KT***G****VDKPKEEK							

Fig. 18. Variaciones en las secuencias de aa de los alelos LytA de tipo fágico de las estirpes de SMG estudiados en esta Tesis respecto de los alelos LytA_{PPH}. Se muestran todos los aa encontrados en cada posición de la proteína en los diferentes alelos LytA_{PPH}. Los asteriscos indican aa idénticos. En gris se encuentra resaltado el dominio de unión a colina (CBD). Los guiones representan espacios introducidos para optimizar el alineamiento. Las posiciones de los aminoácidos han de leerse en vertical.

		1	2	3	4	5	6	7
		0	0	0	0	0	0	0
Alelo								
LytA ₂ SPH	MDIDTSRLRTDLPIVGFEPRQVHAHSTGNRNSTVQNEADYHYRKDPGLGFFSHVVGNGRVMQVGPVNNG							
		Q	VQ	Y	A	N		K
LytA _{SK970}	*E**K*****N**QI*EQ*Y*****P**A*****MRRPV*S*****I**L*TWL*DR*							
LytA _{SK1073}	*EV*K*****N**QI*EQ*Y*****P**A*****LRRPV*S*****I**TWL*DR*							
LytA _{SK313}	*****QI*EQ*Y**I*****P**A*****MRRPVDS*****TWYTD**							
LytA _{SK2}	*****Q*EQ*Y**I*****P**A*****MRRPVDS*****TWYTD**							
LytA _{SK1}	*****Q*EQ*Y**I*****P**A*****MRRPVDS*****S****TWYTD**							
		7	8	9	0	1	2	3
		1	0	0	0	0	0	0
LytA ₂ SPH	SWDVGGGWNAETYAABELIESHSTKEEFMEDYRLYIELLRNLADEADLPKTLDTDDLEGIKTHEYCTNNQ							
		M	NE			G		A
LytA _{SK970}	AY*****V*G**Q*****ESK*****R*****VK***E*****GI*****SSS*A*****QF**Y**							
LytA _{SK1073}	AY*****V*G**Q*****ESK*****R*****VK***E*****GI*****SSS*A*****QF**Y**							
LytA _{SK313}	AY*****V*G**Q*****ATK*****R**K**V*****GI*****S*S*A*****Q**Y**							
LytA _{SK2}	AY*****V*G**Q*****TK*****R**K**V*****GI*****S*S*A*****Q**Y**							
LytA _{SK1}	AY*****V*G**Q*****ETK*****R**K**V*****GI*****S*S*A*****Q**Y**							
		1	1	1	1	1	2	2
		4	5	6	7	8	9	0
		1	0	0	0	0	0	0
LytA ₂ SPH	PNNNSDHVDPYPYLAKWGVSRQFKRDIENGLGSETGWQKNSTGYWYVHSDGSYPKDKFKIDGTWYFYD							
		D	R	I		Q	TI	A
							K	D
							YE	E
								VN
LytA _{SK970}	*N*G***V*****I*****K***S*-T*GN*KR*EV*W*WEEA*****SQWKNIK*E*F***							
LytA _{SK1073}	*N*G***V*****I*****K***S*-T*GN*KR*EV*W*WEEA*****SQWKNIK*E*F***							
LytA _{SK313}	*R*S***V*****I*****K***G*-S*A**RQ*AS*W*WEEA*****TKTWKQIK*E*F**N							
LytA _{SK2}	*R*Y***V*****I*****K***G*-S*A**RQ*AS*W*WEEA*****TKTWKQIK*E*F**N							
LytA _{SK1}	*R*Y***V*****I*****K***G*-S*A**KQ*G*W*WEEA*****TNRWKQINNE*FR**							
		2	2	2	2	2	2	2
		1	2	3	4	5	6	7
		1	0	0	0	0	0	0
LytA ₂ SPH	GGGYMLADRWKKHNSNGNWFNDNSGEMATGWKKISEKYYFDVEGAMKTGWVKYKDTWYLDGKEGTMVS							
			D	Q		A		
							SQD	N
							R	N
LytA _{SK970}	NR**CFINK*FND-GKD*FYL*KR*A*V***MH*DHR***KSD*R*AK*****RE*****EKD*D*K*							
LytA _{SK1073}	NR**CFINK*FND-GKD*FYL*KR*A*V***MH*DHR***KSD*R*AK*****RE*****EKD*D*K*							
LytA _{SK313}	ER**C*IN**FND-GKD*FYL*KR*A*V***MFLNHR**F*KSD*R*A*****RE***FMEEKD*Y*L*							
LytA _{SK2}	ER**C*IN**FND-GKD*FYL*KR*A*V***MFLNHR**F*KSD*R*A*****RE***FMEEKD*Y*L*							
LytA _{SK1}	ER**C*IN**FND-GKD*FYL*KR*A*V***MFLNHR**F*KSD*R*A*****RE***FMEEKD*Y*L*							
		2	2	3	3	3		
		8	9	0	1	2		
		1	0	0	0	5		
LytA ₂ SPH	NAFIQSADKTGWYLLKPDGTMADKPEFTVEPEGLITTK							
		E	VRAGQG--					
			K					
LytA _{SK970}	KQ*IKSGNG--***LKS**SLSV*P***I**D*****N							
LytA _{SK1073}	KQ*IKSGNG--***LKS**SLSV*P***I**D*****N							
LytA _{SK313}	KQ*IKSGDG--***LKAN*ELHTDPA*KT**D****VVDKPKEEK							
LytA _{SK2}	KQ*IKSGDG--***LKAN*ELHTDPA*KT**D****VVDKPKEEK							
LytA _{SK1}	KQ*IKSGDG--***LKAN*ELHTDPA*KT**D****VVDKPKEEK							

Fig. 19. Variaciones en las secuencias de aa de los alelos LytA de tipo fágico de las estirpes de SMG estudiados en esta Tesis respecto de los alelos LytA_{SPH}. Se muestran todos los aa encontrados en cada posición de la proteína en los diferentes alelos LytA_{SPH}. Los asteriscos indican aa idénticos. En gris se encuentra resaltado el CBD. Los guiones representan espacios introducidos para optimizar el alineamiento. Las posiciones de los aminoácidos han de leerse en vertical.

4.2. Características de las estirpes de SMG donde se han encontrado nuevos genes de tipo *lytA*

4.2.1. Curvas de crecimiento y características fenotípicas de *S. infantis* SK970, *S. mitis* SK597, *S. mitis* SK1073, *S. oralis* SK313 y *S. oralis* ATCC 49296

Como ya se ha mencionado anteriormente, *S. pneumoniae* y algunos SMG presentan una lisis característica durante la fase estacionaria que es debida a la acción de su principal autolisina, *LytA*. La actividad de las CBPs se ve inhibida cuando el medio de cultivo se suplementa con cloruro de colina al 2%, de tal manera que no sólo no se produce la lisis sino que, además, se forman cadenas celulares debido a que la actividad de *LytB* (u otras proteínas similares) también se encuentra inhibida. Con el fin de detectar la expresión y actividad de la proteína *LytA*, principalmente, estas cepas de SMG se incubaron tanto en medio C+Y como en C+Y al que se añadió cloruro de colina al 2% (C+Y+Cho). Se siguió el crecimiento durante 24 h (Fig. 20) observándose que todas las cepas, con excepción de *S. infantis* SK970, presentaban un tiempo de duplicación muy similar en ambos medios así como ausencia de lisis en la fase estacionaria. *S. infantis* SK970, sin embargo, sí se lisaba en la fase estacionaria cuando se incubaba en medio C+Y. Cuando las cepas cultivadas en C+Y se examinaron al microscopio (Fig. 21) se observaron diplococos y cadenas cortas (4–8 células), mientras que en C+Y+Cho, formaban cadenas largas (50–70 células), particularmente en el caso de *S. infantis* SK970 (140–180 células).

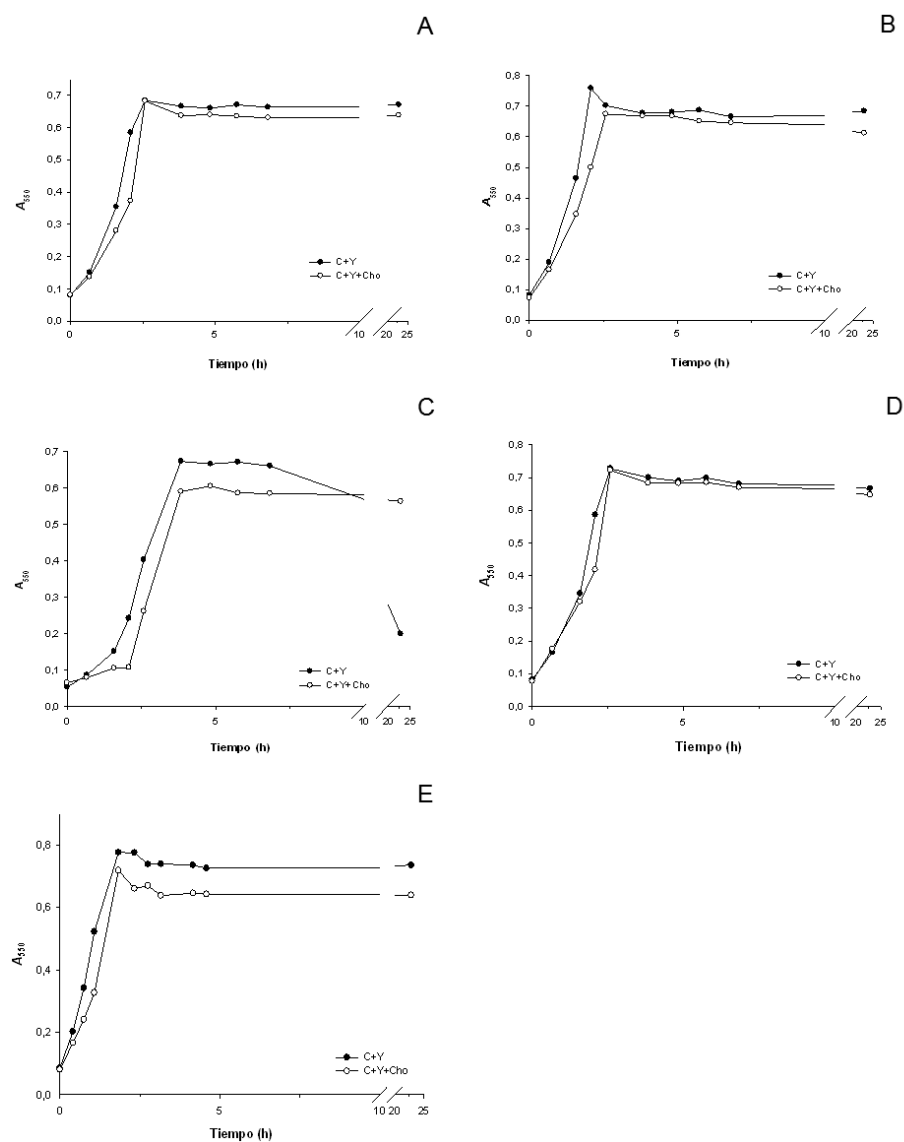


Fig. 20. Curvas de crecimiento de las cepas de SMG en los medios de cultivo C+Y y C+Y+Cho. A, *S. oralis* SK313; B, *S. mitis* SK597; C, *S. infantis* SK970; D, *S. mitis* SK1073; E, *S. oralis* ATCC 490296.

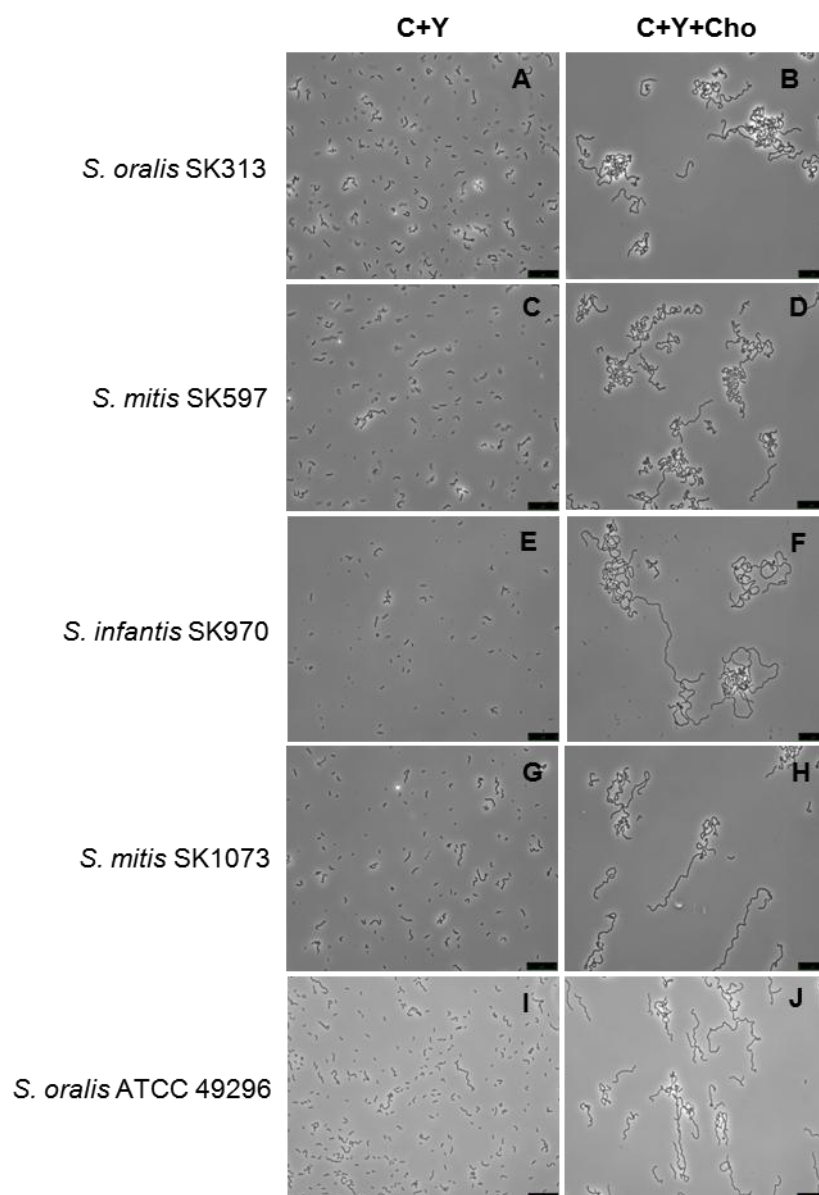


Fig. 21. Imágenes de microscopía de contraste de fases de las cepas de SMG estudiadas.

Ya se ha comentado que, mientras que un cultivo de *S. pneumoniae* se lisa en presencia tanto de Doc al 1% como de Tritón-X100 al 1% debido a la acción de la proteína LytA de 318 aa, las estirpes de SMG que presentan proteínas LytA de 316 aa de tipo bacteriano, no lo hacen en presencia de Doc al 1% pero sí de Tritón-X100 al 1% o Doc al 0.1% (Díaz *et al.*, 1992; Obregón *et al.*, 2002; Balsalobre *et al.*, 2006; Llull *et al.*, 2006). Por esta razón, se realizó un ensayo de susceptibilidad de las bacterias a ambos detergentes (Tabla 20). *S. infantis* SK970, a pesar de poseer un gen *lytA* de tipo fágico, se lisó tanto en presencia de Doc como de Tritón-X100 al 1% mientras que *S. mitis* SK597, que posee un gen *lytA* de tipo bacteriano, no se lisó en presencia de ninguno de los dos detergentes. El resto de estirpes, *S. oralis* SK313 y ATCC 49296 y *S. mitis* SK1073 (sus genes *lytA* son de tipo fágico), tampoco lo hicieron en presencia de ninguno de ellos.

4.2.2. Presencia de colina en la pared celular

Existen numerosos estudios que por medio de diferentes técnicas (inmunoensayos, estudios de incorporación de colina radiactiva a la pared celular, cromatografía y espectrometría, detección de los *loci lic* por PCR, etc.) han demostrado la presencia de colina en la pared celular de diferentes estreptococos como *S. pneumoniae*, *S. mitis* y *S. oralis* (Kilpper-Bälz *et al.*, 1985; Ronda *et al.*, 1991; Gillespie *et al.*, 1993; Horne y Tomasz, 1993; Kolberg *et al.*, 1997; García *et al.*, 1998; Gmür *et al.*, 1999; Bergström *et al.*, 2000; Hakenbeck *et al.*, 2009). Kilian *et al.* (2008) obtuvieron dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos característicos de la estructura del polisacárido C y residuos de fosforilcolina, respectivamente. Gracias a estos anticuerpos, estos autores detectaron la presencia de colina en todas las cepas analizadas de *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae* y *S. oralis*; también detectaron colina en la mayoría de las cepas de *S. mitis* (las que no presentaban colina presentaban el aminoalcohol etanolamina) y las cepas de *S. infantis* mostraban una presencia variable de los dos epítomos. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se procedió a inspeccionar la presencia de colina en la pared celular de las cepas en estudio, determinando si la autolisina de R6 (LytA_{R6}) era capaz de hidrolizar las paredes de estas cepas ya que en el caso de que no hubiera colina en sus paredes la LytA_{R6} sería incapaz de hidrolizarlas. Para ello, se realizaron ensayos sobre cultivos líquidos a los cuales se añadió proteína LytA_{R6} pura (10 µg de LytA_{R6}/ml de cultivo, equivalente a 10 000 U/ml de cultivo. Se dejó incubando durante una hora y se

realizó la prueba del Doc al 1% pudiéndose comprobar cómo todas las cepas se lisaban en presencia de Doc.

4.2.3. Inducción de fagos atemperados

Debido a que los genes *lytA* de las estirpes de estreptococos estudiadas en esta Tesis son mayoritariamente de tipo fágico, excepto en el caso de *S. mitis* SK597, se realizaron ensayos de inducción con mitomicina C con el fin de averiguar si estos genes formaban parte de profagos viables y su LytA era lo suficientemente activa como para provocar la lisis celular (Tabla 20). La curva de crecimiento característica de una cepa bajo condiciones de inducción de fagos atemperados consiste en un crecimiento de la cepa moderado (hasta una A_{550} de la mitad que en condiciones normales, aproximadamente) y una lisis acentuada (total o casi total) del cultivo en la fase estacionaria. Se observó que *S. oralis* SK313, *S. mitis* SK597 y *S. mitis* SK1073 no se lisaban en presencia de mitomicina C, aunque sí presentaban un crecimiento más reducido que en condiciones normales (entre 25–40% menos de A_{550} con respecto al control). Nótese que la $LytA_{SK597}$ era de tipo bacteriano y no fágico. Sin embargo, en el caso de *S. infantis* SK970 y *S. oralis* ATCC 49296, la mitomicina C sí inducía la lisis. Romero *et al.* (2004a) describieron que las cepas de *S. mitis* HER y B6 (poseen alelos de tipo fágico de 318 aa: *lytA*_{2_SPH} y *lytA*_{3_SPH}, respectivamente) no se lisaban al final de la fase estacionaria salvo cuando se inducían sus profagos con mitomicina C. Asimismo, una vez inducidos los profagos, estas cepas se lisaban en presencia de Doc al 1%. Por este motivo, durante el ensayo de inducción de fagos atemperados, también se realizaron pruebas de lisis con Doc al 1% una hora y 2 h después de haber añadido mitomicina C. Únicamente se lisaron los cultivos con y sin mitomicina C de la cepa SK970 de *S. infantis*.

Tabla 20. Lisis de las estirpes de SMG estudiadas en esta Tesis en diferentes condiciones de cultivo

Estirpe (tipo alelo <i>lytA</i>)	Final fase estacionaria ^a	Final fase estacionaria + 2% Cho ^b	Doc 1% ^c	Tritón 1% ^d	Mitomicina C ^e	Mitomicina C + Doc 1% ^f
<i>S. infantis</i> SK970 (Fágico)	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí
<i>S. mitis</i> SK597 (Bacteriano)	No	No	No	No	No	No
<i>S. mitis</i> SK1073 (Fágico)	No	No	No	No	No	No
<i>S. oralis</i> SK313 (Fágico)	No	No	No	No	No	No
<i>S. oralis</i> ATCC 49296 (Fágico)	No	No	No	No	Sí	No

^a Lisis en la fase estacionaria de un cultivo líquido en C+Y de cada una de las estirpes.

^b Lisis en la fase estacionaria de un cultivo líquido en C+Y+ 2% de cloruro de colina de cada una de las estirpes.

^c Lisis en presencia de Doc al 1% de una muestra de cultivo líquido en C+Y de cada una de las estirpes.

^d Lisis en presencia de Tritón al 1% de una muestra de cultivo líquido en C+Y de cada una de las estirpes.

^e Lisis, por inducción de fagos atemperados, de un cultivo líquido en C+Y+ mitomicina C de cada una de las estirpes.

^f Lisis en presencia de Doc al 1% de una muestra de cultivo líquido en C+Y+ mitomicina C de cada una de las estirpes.

4.3. Actividad de los alelos *LytA*_{Spn}, *LytA*_{SMG} y *LytA*_{SPH} de las estirpes estudiadas en esta Tesis

Actualmente, la caracterización de la actividad NAM-amidásica de los alelos *LytA* se encuentra circunscrita casi exclusivamente a sólo dos alelos: *LytA*_{1_Spn} y *LytA*_{2_Spn} (Tabla 7) (López y García, 2004; Moscoso *et al.*, 2010). Todavía es menor a este respecto nuestro conocimiento en lo que se refiere a las enzimas codificadas por profagos. En el caso de las enzimas líticas de *S. mitis* y otros SMG, se han caracterizado en detalle las enzimas de la cepa 101/87 (*LytA*_{101/87} de tipo bacteriano y Ejl de tipo fágico; Díaz *et al.*, 1992; Obregón *et al.*, 2002) así como las de las cepas B6 y HER (ambas de tipo fágico) (Romero *et al.*, 2004). Por último, hay que destacar

que, hasta el momento, no se ha cuantificado la actividad NAM-amidasa presente de manera natural en cepa alguna de *S. infantis* o *S. oralis*.

A lo largo del desarrollo de esta Memoria se han descrito 30 alelos *lytA_{Spn}* que dan lugar a 15 alelos *LytA_{Spn}* (Tabla 14). Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la funcionalidad de estos alelos proteicos y encontrar una posible explicación a la variabilidad alélica, se procedió al estudio comparativo de su actividad lítica. Por otro lado, ante las peculiaridades a nivel de nt y aa de los alelos *lytA_{SMG/SPH}* y *LytA_{SMG/SPH}* descritos en este apartado y por la falta de datos en cuanto a actividad de este tipo de enzimas de SMG, se analizaron sus actividades tanto sobre paredes de neumococo como sobre cultivos líquidos de los diferentes SMG.

4.3.1. Actividad in vitro de los alelos *LytA_{Spn}*, *LytA_{SMG}* y *LytA_{SPH}*

Para la realización de los ensayos de actividad sobre paredes de *S. pneumoniae*, primeramente se clonaron los genes correspondientes a los alelos *lytA_{Spn}*, *lytA_{SMG}* (*lytA_{SK597}*) y *lytA_{SPH}* (*lytA_{SK313}*, *lytA_{SK970}*, *lytA_{SK1073}*, *lytA_{Sor_1}* y *lytA_{Sor_2}*). A continuación, estos genes se expresaron y las proteínas correspondientes se purificaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. Ante la incapacidad de disponer de algunas de las cepas de neumococo, se clonaron únicamente los alelos *LytA_{Spn}* mostrados en la Fig. 22A. Todos los alelos *LytA* presentaban una movilidad en la electroforesis acorde con su masa molecular teórica, excepto *LytA_{SK597}*, la cual mostraba una movilidad ligeramente menor que la deducida a partir de su secuencia de aa (Fig. 22). Esta discrepancia entre la masa molecular teórica y la correspondiente a su movilidad electroforética, ya se ha descrito en otros alelos *LytA* como, por ejemplo, en el caso de la *LytA₁₀₁* (*LytA_{1-SMG}*) (Díaz *et al.*, 1992a). Una posible causa de esta discrepancia podría ser que el cambio de un solo aa puede producir cambios en la movilidad electroforética por alteración del número de moléculas de SDS que se unen a dicha proteína; ello, podría ser debido a, por ejemplo, cambios en la hidrofobicidad de la proteína que pueden facilitar interacciones hidrofóbicas con el SDS [véase Shi *et al.*, (2012) para una revisión].

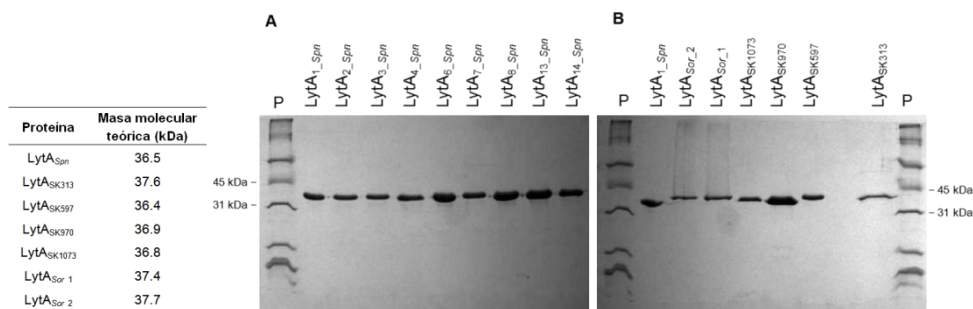


Fig. 22. Electroforesis en geles de 12.5% poliacrilamida-SDS de los alelos LytA purificados y su masa molecular teórica. (A) Alelos LytA_{Spn}. (B) Alelos LytA_{SMG}. P, patrón de masa molecular.

Seguidamente, se realizaron los ensayos de actividad sobre paredes de neumococo. En la Fig. 23 se muestran los porcentajes de actividad de los diferentes alelos LytA_{Spn} purificados en relación al alelo LytA_{1_Spn} (alelo correspondiente a la cepa R6 de *S. pneumoniae*). Los alelos LytA_{7_Spn} [presente en cepas con serotipos 11A (ST62) u 11D (ST62)] y LytA_{14_Spn} (presente únicamente en una cepa de serotipo 19A/ST276) presentaban una actividad lítica significativamente superior (28–34%; $P < 0.0001$) mientras que la actividad encontrada en el alelo LytA_{8_Spn} (presente en cepas de serotipo 1 y ST227, ST304 y ST306) era inferior (25%; $P < 0.0003$). En la figura 24 se muestran los porcentajes de actividad de los alelos LytA_{SMG/SPH} analizados en este apartado respecto del alelo LytA_{1_Spn}. Todos los alelos presentaban una diferencia significativamente muy inferior (entre 70 y 97%; $P < 0.0001$) a la que presenta el alelo LytA_{1_Spn} de referencia. Se ha descrito que las NAM-amidasas de tipo fágico —tanto de SMG (Ejl, LytA_{B6} y LytA_{HER}) como de *S. pneumoniae* (Hbl)—, tienen un pH óptimo más ácido (pH 5.5–6) que el de las NAM-amidasas neumocócicas de tipo bacteriano (pH 6.9). Sin embargo, la actividad de los alelos LytA_{SMG/SPH} a pH 6.9 era igual o mayor que a pH 5.5.

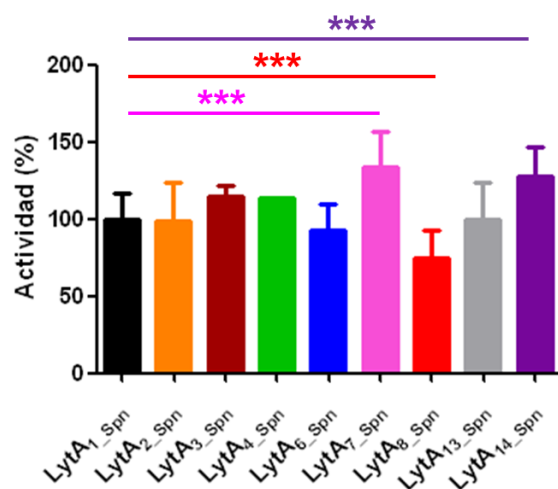


Fig. 23. Actividad NAM-amidasa relativa de los alelos LytA_{Spn} sobre paredes de neumococo marcadas radiactivamente. Los ensayos se realizaron a pH 6.9. ***, $P < 0.0003$.

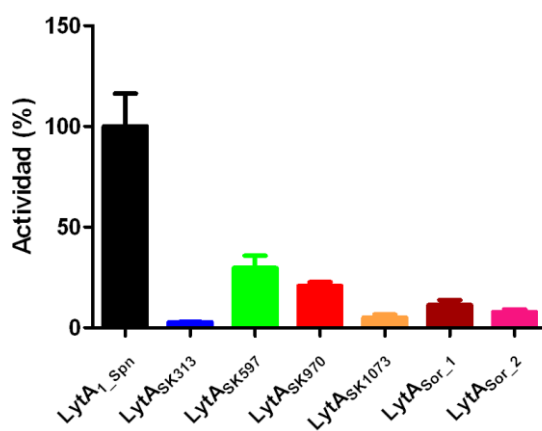


Fig. 24. Actividad NAM-amidasa relativa de los alelos LytA_{SMG/SPH} estudiados en este apartado sobre paredes de neumococo marcadas radiactivamente. Los ensayos se realizaron a pH 6.9.

4.3.2. Actividad sobre cultivos bacterianos

Para tratar de reproducir las diferencias en la actividad NAM-amidasa encontradas entre los alelos LytA_{Spn} y $\text{LytA}_{\text{SMG/SPH}}$ o de advertir alguna otra diferencia entre dichos alelos no descubierta en los ensayos *in vitro*, se realizaron una serie de ensayos de actividad sobre cultivos planctónicos de *S. pneumoniae* M32 (ΔlytA32), *S. infantis* SK970, *S. mitis* SK597, *S. mitis* SK1073, *S. oralis* SK313 y *S. oralis* ATCC 49296. Estos ensayos consistieron, por un lado, en la observación de la lisis de los cultivos tras la adición de las mismas unidades (U) de actividad enzimática de cada uno de los alelos purificados de la NAM-amidasa LytA a un cultivo líquido de las diferentes cepas de estreptococos señaladas anteriormente y, por otro, en la toma de una muestra de cada cultivo tras 1 o 2 h de la adición de la enzima pura y la prueba de lisis al añadir Doc. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21 y Fig. 25. A diferencia de los ensayos llevados a cabo utilizando paredes de neumococo marcadas radiativamente (Fig. 23), ninguno de los alelos LytA_{Spn} ensayados presentaba diferencias significativas en cuanto a la lisis que producen en el cultivo de la cepa de neumococo M32 en comparación con la provocada por la NAM-amidasa LytA_{1_Spn} (Tabla 21). Tampoco se observó diferencia alguna en el caso de la sensibilización a la lisis de M32 en presencia de Doc y de los diferentes alelos LytA_{Spn} (Fig. 25). Las cepas *S. oralis* SK313 y ATCC 49296, *S. mitis* SK597 y *S. mitis* SK1073 se lisaron peor que *S. pneumoniae* M32, de forma general, en presencia de cualquiera de los alelos LytA_{Spn} , destacando una lisis muy atenuada con los alelos LytA_{6_Spn} y LytA_{8_Spn} en todas las estirpes (Tabla 21). Curiosamente, en todas las cepas, el alelo propio tampoco fue capaz de lisar significativamente la cepa de la cual provenía. Nótese que los ensayos se realizaron añadiendo las mismas U/ml de cada uno de los alelos LytA a los cultivos líquidos de las diferentes estirpes estudiadas. Sin embargo, debido a un menor rendimiento en las purificaciones de $\text{LytA}_{\text{SK970}}$, $\text{LytA}_{\text{SK313}}$, $\text{LytA}_{\text{SK597}}$, $\text{LytA}_{\text{SK1073}}$, $\text{LytA}_{\text{Sor}_1}$ y $\text{LytA}_{\text{Sor}_2}$ las U/ml empleadas con cada estirpe no fueron las mismas. Por lo tanto, las diferencias en la lisis entre los alelos para una cepa determinada son comparables, mientras que las diferencias en la lisis entre cepas no lo son.

RESULTADOS

Tabla 21. Lisis de cultivos de *S. pneumoniae* y de las cepas de SMG estudiadas en presencia de los diferentes alelos *LytA_{Spn}* y *LytA_{SMG/SPH}*^a

NAM-amidasa	<i>S. infantis</i>	<i>S. mitis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. pneumoniae</i>
	SK970	SK597	SK1073	SK313	ATCC 49296	M32 (Δ <i>lytA</i>)
LytA_{1_Spn}	20	68	52	56	44	76
LytA_{2_Spn}	22	69	53	55	46	72
LytA_{3_Spn}	21	68	56	36	47	75
LytA_{4_Spn}	20	66	54	47	40	77
LytA_{6_Spn}	6	13	0	7	6	75
LytA_{7_Spn}	21	70	19	53	51	79
LytA_{8_Spn}	11	43	0	11	0	74
LytA_{13_Spn}	22	69	35	55	42	73
LytA_{14_Spn}	18	67	35	51	42	72
LytA_{SK970}	0	ND	ND	ND	ND	ND
LytA_{SK597}	ND	7	ND	ND	ND	ND
LytA_{SK1073}	ND	ND	0	ND	ND	ND
LytA_{SK313}	ND	ND	ND	9	ND	ND
LytA_{Sor_1}	ND	ND	ND	ND	6	ND
LytA_{Sor_2}	ND	ND	ND	ND	10	ND

^a Porcentajes de lisis de cada estirpe en presencia de cada uno de los alelos *LytA* tomando como 100% la A_{550} máxima que alcanza el cultivo y restando el porcentaje de lisis correspondiente al control (cultivo de la misma estirpe en ausencia de NAM-amidasa). Los ensayos se realizaron añadiendo las mismas U/ml de cada uno de los alelos *LytA* a cultivos líquidos de las diferentes estirpes estudiadas (en el caso de los ensayos con *S. infantis* SK970 y *S. mitis* SK597 se emplearon 6 000 U/ml de cada alelo; con *S. mitis* SK1073 y *S. oralis* ATCC 49296, 600 U/ml; con *S. oralis* SK313, 118 U/ml y con *S. pneumoniae* M32, 12 800 U/ml). Una vez añadidos los alelos *LytA* se incubaron las cepas *S. infantis* SK970, *S. mitis* SK1073 y *S. oralis* ATCC 49296 durante 48 h y el resto de cepas durante 24 h; transcurrido ese tiempo se calcularon los porcentajes de lisis de cada estirpe en presencia de cada uno de los alelos *LytA*. ND, no determinado.

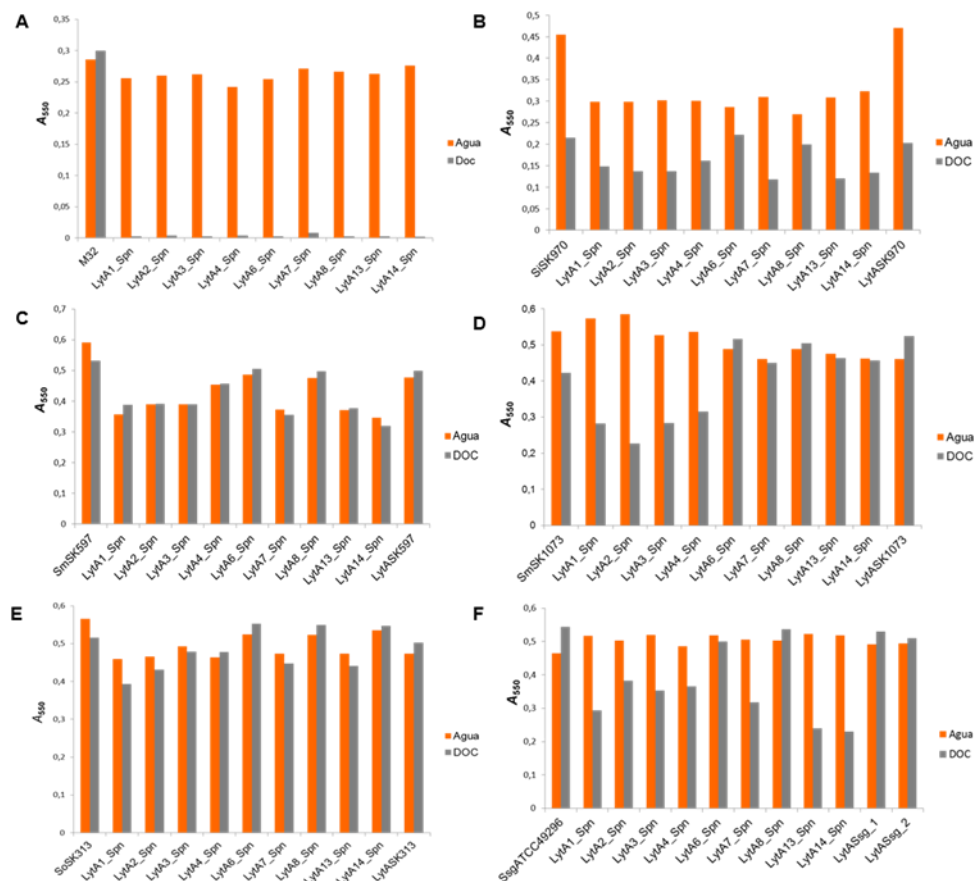


Fig. 25. Lisis en presencia de Doc al 1% y en presencia o ausencia de diferentes NAM-aminidasas LytA. Se tomaron muestras de los cultivos de cada estirpe tras 1 o 2 h de la adición de cada uno de los alelos LytA estudiados y se les realizó la prueba de lisis en presencia de Doc al 1%. A, *S. pneumoniae* M32 (Δ lytA); B, *S. infantis* SK970; C, *S. mitis* SK597; D, *S. mitis* SK1073; E, *S. oralis* SK313; F, *S. oralis* ATCC 49296

5. LOS DIVERSOS CLADOS DE LYTA PRESENTAN DIFERENTES RESIDUOS EN POSICIONES ESPECÍFICAS QUE COLOCALIZAN EN LA ESTRUCTURA

Dentro de una misma familia proteica, existen residuos conservados en subfamilias que, a su vez, son distintos respecto a otras subfamilias. Estos residuos, localizados en las denominadas posiciones determinadoras de especificidad (*specificity determining positions* o SDPs), se consideran responsables de sutiles diferencias de actividad (rango de sustrato, dinámica proteica, interacciones con otras proteínas, etc.) dentro de un mismo contexto funcional (Kalinina *et al.*, 2004). Se predijeron las SDPs de los clados (o subfamilias) LytA_{PPH} , LytA_{SMG} y LytA_{SPH} frente a LytA_{Spn} (Tabla 22). Del total de 54 SDPs de estos tres clados respecto al de referencia, sólo 10 coincidían en, al menos, dos casos (Fig. 26A). Esta independencia en las posiciones sustituidas podría justificarse porque las fuerzas de selección que han operado sobre ellas han sido diferentes. De estas diez SDPs, sólo dos (con la misma sustitución), fueron comunes en los tres clados: H32N y C60R, pudiendo considerarlos, por tanto, como los únicos residuos específicos de LytA_{Spn} .

Para abordar la posible implicación estructura-función de aquellos residuos, se construyó un modelo para el dominio amidasa ya que el dominio CBD ya está resuelto estructuralmente (código PDB: 1HCX). Por ser la más parecida al dominio amidasa de LytA (21% de identidad y 37% similitud), se seleccionó la estructura de la endolisina XlyA codificada por el profago defectivo PBSX de *Bacillus subtilis* 168 (código PDB: 3HMB) (Longchamp *et al.*, 1994; Low *et al.*, 2011) aunque, obviamente, no se pueden predecir sus contactos con el dominio CBD al no disponer de la estructura de la proteína completa. Cuando los SDPs se localizaron en la estructura, se encontró una fuerte correlación posicional dependiente de clado, tanto en el dominio amidasa (Fig. 26B) como en el CBD (Fig. 26C). Concretamente, en el dominio amidasa los cambios del clado LytA_{PPH} se concentraban en el lateral izquierdo (según la perspectiva de la Fig. 26B), mientras que los de LytA_{SPH} lo hacían en la región basal (que interacciona potencialmente con el dominio CBD) y los de LytA_{SMG} en la apical (más expuestos al solvente). En el CBD, los cambios del clado LytA_{PPH} aparecían en las dos primeras repeticiones, los del LytA_{SPH} tendían a localizarse en la primera, quinta y sexta, mientras que los de LytA_{SMG} se concentraban entre la segunda y cuarta repetición, ambas inclusive.

Tabla 22: SDPs encontrados entre los diferentes clados de la proteína LytA

Posición	Clado ^a			Alelos nuevos ^b	Localización ^c	
	Spn	PPH	SMG		Elemento SS	Dominio
2	E	D			Nt	Tallo N-t
4	N	D		D	Nt	Tallo N-t
7	K	R			S1	Tallo N-t
11	D	G			S1-S2	Tallo N-t
17	V			E	S1-S2	Amidasa
31	Ps		R		S2-H1	Amidasa
32	H	N	N	N	S2-H1	Amidasa
35	V			A	H1	Amidasa
43	W		Y		H1	Amidasa
46	D			P	H1-S3	Amidasa
49	L			S	H1-S3	Amidasa
55	I	V			S3	Amidasa
60	C	R	R	R	S4	Amidasa
64	V			I	S4	Amidasa
80	A			V	S5-S6	Amidasa
82	T			G	S5-S6	Amidasa
85	A		Q	Q	S6	Amidasa
93	S		E		S6-S7	Amidasa
94	T		S		S6-S7	Amidasa
99	M		L/r		H2	Amidasa
100	T		I	R	H2	Amidasa
124	T			S	S8-S9	Amidasa
126	S		D		S8-S9	Amidasa
134	E			Q	S9	Amidasa
138	N			Y	S9	Amidasa
174	I	A			S	CBD (CBR1)
175	E	A			S	CBD (CBR1)
180	H		Q		S	CBD (CBR1)
185	Y		T	W	L	CBD (CBR1)
189	H			E	L	CBD (CBR1)
196	T		A		L	CBD (CBR1/2)
199	F			W	S	CBD (CBR2)
200	E			K	S	CBD (CBR2)
205	T			E	S	CBD (CBR2)
210	R	K			L	CBD (CBR2)
211	S	G			L	CBD (CBR2)
212	S			R	L	CBD (CBR2)
215	M			C	S	CBD (CBR2)
217	A			I	S	CBD (CBR2/3)
221	R			F	S	CBD (CBR3)
222	K			N	S	CBD (CBR3)
223	H			D	L	CBD (CBR3)
225	D			K	L	CBD (CBR3)
233	N		Q	K	L	CBD (CBR3)
236	E			A	L	CBD (CBR3)
242	K			M	S	CBD (CBR4)
256	A			R	L	CBD (CBR4)
258	K			A	S	CBD (CBR5/6)
273	A		S	E	L	CBD (CBR5)
275	E		N		L	CBD (CBR5)
277	A		D		L	CBD (CBR5)
285	Q		K	K	S	CBD (CBR6)
287	A		N	G	L	CBD (CBR6)
297	P		E		L	CBD (CBR6/7)

^a Con fondo gris se encuentran resaltados las sustituciones semi-conservativas, con fondo negro las sustituciones no conservativas y con fondo blanco las conservativas. L/r, en dicha posición se puede encontrar una leucina (L) o una arginina (r, en minúscula porque se encuentra en menor proporción).

^b Alelos correspondientes a las cepas *S. mitis* SK1073, *S. infantis* SK970, *S. oralis* SK313 y ATCC 49296

^c Elemento SS, elemento de estructura secundaria de acuerdo con la predicción por PSI-PRED.

H, hélice; S, lámina β ; L, *loop*; Nt, N-terminal.

Estas sustituciones sugerían diferencias entre los clados tanto en las propiedades catalíticas, como en la afinidad de anclaje por las moléculas de colina o por sí misma durante el proceso de dimerización. Desafortunadamente, en ausencia de una estructura, el sitio activo de LytA no está caracterizado. Sin embargo, un 90% de los centros activos de las enzimas pueden localizarse como una de los tres cavidades principales en la estructura proteica, además de que tienden a estar más conservados por la alta presión selectiva por mantener la afinidad por el ligando y la función (Huang y Schroeder, 2006; Xie y Hwang, 2012). Para comprobar si las SDPs de cada clado se encontraban cerca del centro activo se buscaron las cavidades más voluminosas sobre el modelo estructural generado para el dominio amidasa (Fig. 27A).

También se determinó el grado de conservación de cada posición mediante entropía relativa, un algoritmo más eficiente que la identidad y la similitud para detectar conservación ya que cuantifica la dispersión de composición en una posición más allá del residuo más abundante y lo normaliza respecto a su grado de abundancia en las proteínas. Dicho de otro modo, este procedimiento no considera igual un residuo conservado de alanina (muy abundante en las proteínas) que uno de triptófano (poco abundante). Al valor de entropía relativa de cada posición se le aplicó una ventana de 7 posiciones, correspondiente, aproximadamente, a un elemento de estructura secundaria, para calcular el valor del entorno. Se encontraron una serie de picos de conservación a lo largo de la secuencia (Fig. 27B) que, una vez localizados en la estructura, tendían a rodear la principal cavidad detectada (Fig. 27C), localizada en la región apical de la proteína.

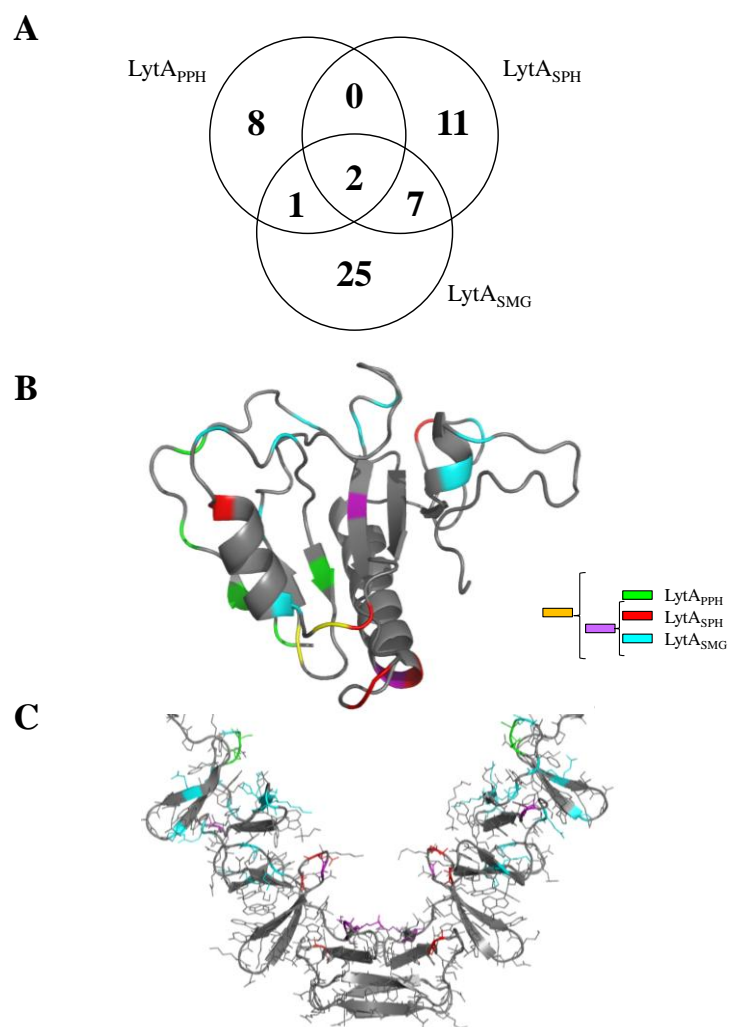


Fig. 26. Localización de las posiciones determinantes de especificidad (SDPs) en los diferentes clados de LytA. (A) Diagrama de Venn que muestra las coincidencias de los SDPs entre los tres clados analizados respecto al clado LytA de referencia. Los SDPs determinados (Tabla 22) de los clados LytA_{PPH}, (verde), LytA_{SMG} (celeste) y LytA_{SPH} (rojo), se localizaron en el modelo del dominio amidasin (B) y en la estructura del dominio CBD (C).

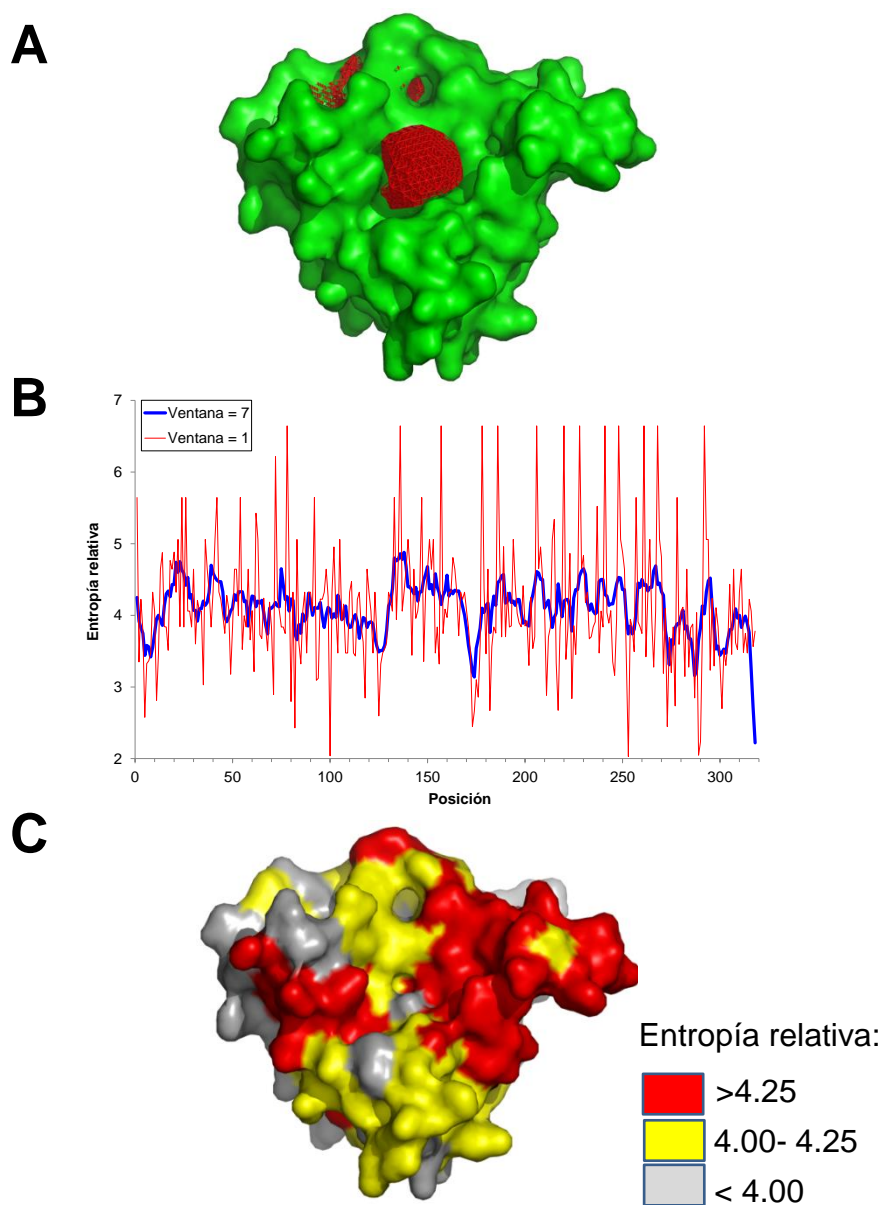


Fig. 27. Predicción de cavidades y su conservación en el modelo del dominio amidasa de LytA. (A) Estructura en modo superficie con las predicciones de cavidades mediante el algoritmo LISE. En rojo, se indican las cavidades más voluminosas. (B) Entropía relativa en secuencia basada en una posición (rojo) o en una ventana de 7 posiciones (azul). (C) Entropía relativa en estructura al aplicar la ventana de siete posiciones. Se indican las posiciones altamente conservadas (rojo), las de conservación media (amarillo) y las poco conservadas (gris).

6. APORTACIÓN AL POSIBLE ORIGEN DEL GEN *lytA* DE *S. PNEUMONIAE* Y OTROS SMG

El estudio de los genes que rodean al gen *lytA* y su posible transmisión conjunta entre bacterias de la misma o diferentes especies, permitiría una mejor comprensión de la evolución de este gen y su implicación en la filogenia y taxonomía del género *Streptococcus*. En el cromosoma de las estirpes de neumococo TIGR4, R6 y D39, el gen *lytA* se encuentra situado entre dos genes importantes: *recA* y *ply*. RecA es una enzima que posee un papel fundamental en la reparación durante la recombinación de DNA (Wingley, 2013). En neumococo, RecA es la proteína responsable de los procesos de recombinación homóloga durante la transformación genética y de la inducción de profagos (Martin *et al.*, 1995). Además, los genes *recA* y *lytA* de *S. pneumoniae* se encuentran formando parte de un operón que se induce durante el desarrollo de la competencia para transformación genética (Mortier-Barrière *et al.*, 1998). Entre *recA* y *lytA* se encuentra el gen *dinF* que codifica una proteína de la familia MATE (*multiantimicrobial extrusion*) de bombas de expulsión para diversos agentes antimicrobianos (Tocci *et al.*, 2013). Por su parte, la neumolisina (Ply) es una citolisina muy importante para la virulencia de neumococo (Marriott *et al.*, 2008; Vernatter y Pirofski, 2013; Lucas *et al.*, 2013). Durante mucho tiempo se consideró que el gen que codifica la neumolisina (*ply*) era específico de *S. pneumoniae* pero estudios posteriores demostraron que también era posible encontrarlo en algunos aislados de SMG (Blaschke, 2011). Estudios recientes utilizando PCR e hibridación de *Southern* han puesto de manifiesto la presencia de ambos genes en algunas cepas de *S. mitis* y *S. pseudopneumoniae* pero, con excepción de la cepa “híbrida” SK597, en ninguna de las ensayadas pertenecientes a los *cluster* Oralis o Infantis (Kilian *et al.*, 2008). Hay que resaltar, no obstante, que la posible presencia de genes tipo *lytA* fágicos no fue tenida en cuenta a la hora de diseñar los oligonucleótidos utilizados o la posible existencia de hibridaciones cruzadas.

Al analizar la secuencia situada entre los genes *dinF* y *lytA* (377 pb) en los 27 genomas de neumococo cuya secuencia completa está disponible (20 de septiembre de 2013) (Tabla 23), se observó que se encuentra altamente conservada, con ≥ 372 pb idénticas (Fig. 28A). Sorprendentemente, el extremo de esta secuencia (53 pb), próximo al codón de terminación de *dinF*, se encontraba repetido de forma directa (con un 94% de identidad) en otro lugar del genoma, concretamente en posición 3' del gen de la neumolisina. Esta observación sugería un análisis más detallado de la secuencia en cuestión (Fig. 28B). Para ello, se

RESULTADOS

amplió el rango de alineamiento a los nucleótidos 1 730 500 y 1 731 000 del genoma de la cepa D39, considerando que el gen *lytA* empieza en 1 730 557 y el *dinF* termina en 1 730 933. El resultado fue que la región conservada entre las regiones 5' de *lytA* y 3' de *ply* tenía en realidad 104 pb, compartiendo ambas copias un 85% de identidad.

Tabla 23. Genomas completos de neumococo disponibles en las BD

Estirpe ^a	Longitud (bp)	Número de acceso
670-6B	2 240 045	gb CP002176.1
70585	2 184 682	gb CP000918.1
A45	2 129 934	emb HE983624.1
AP200	2 130 580	gb CP002121.1
ATCC 700669	2 221 315	emb FM211187.1
CGSP14	2 209 198	gb CP001033.1
D39	2 046 115	gb CP000410.1
G54	2 078 953	gb CP001015.1
gamPNI0373	2 064 154	gb CP001845.1
Hungary19A-16	2 245 615	gb CP000936.1
INV104	2 142 122	emb FQ312030.1
INV200	2 093 317	emb FQ312029.1
JJA	2 120 234	gb CP000919.1
OXC141	2 036 867	emb FQ312027.1
P1031	2 111 882	gb CP000920.1
PCS8235	2 073 383	ref NZ_CM001835.1
R6	2 038 615	gb AE007317.1
SPN032672	2 131 190	emb FQ312039.1
SPN033038	2 133 496	emb FQ312042.1
SPN034156	2 024 476	emb FQ312045.1
SPN034183	2 037 254	emb FQ312043.1
SPN994038	2 026 239	emb FQ312041.2
SPN994039	2 026 505	emb FQ312044.2
ST556	2 145 902	gb CP003357.1
Taiwan19F-14	2 112 148	gb CP000921.1
TCH8431/19A	2 088 772	gb CP001993.1
TIGR4	2 160 842	gb AE005672.3

^a Ordenaci n alfab tica.

A

```

1730557 TATTCTACTCCTTATCAATTAAACAACACTATTTTTTACAATCCAGAACCAGAACTCCT 1730616
1730617 TTATTTCACCTTACAAGAAGACAATCTTAGTCACGATTAGGCTTGTAGATAGAACTTC 1730676
1730677 AAAACGCACATTTTTGACACTGTAAATAGGACTGACAAGGTCTGCATTCTATCTACAATA 1730736
1730737 ACACCCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTTTC 1730796
1730797 ATAAATACTATACTTTTATATATCATATAAAAGAAGTCAAAAGTCTGTTAAACTATTTTC 1730856
1730857 AACACCAAACATAAGACGAGAACACAAGTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGATT 1730916
1730917 TATTCAGTAAATCCAAC 1730933

```

B

```

5' lytA 1730877 AACACAAGTTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATTCAGTAAATCCAACCTAG 1730936
|||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
3' ply 1720617 AACACAAGTTTTTTTGATTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT-AGCAAATCAAGCTAG 1720675

5' lytA 1730937 GATTGCACCTTTGGTTGCCAAGATTGCCTTGCC-TTCT---TTTATCAA 1730980
||| |||||||  ||| |||||  |||||||  ||||  |||||||  |||||||  |||||||
3' ply 1720676 GATAGCACTTTACCTGCTAAGATGGTCTTGCCCTTCTATCTTTATCAA 1720723

```

Fig. 28. (A) Secuencia de la región conservada entre las posiciones 5' del gen *lytA* y 3' del gen *dinF* en *S. pneumoniae*. Se muestra la secuencia correspondiente a *S. pneumoniae* D39. Las posiciones 1 730 557 y 1 730 933 se encuentran resaltadas en gris y corresponden con la adenina del codón de inicio (ATG) del gen *lytA* y con la guanina del codón de terminación (TAG) de *dinF*, respectivamente. En negro se encuentra resaltada la secuencia repetida en las regiones 5' de *lytA* y 3' de *ply*. (B) Alineamiento de la región conservada de 104 pb entre las regiones 5' de *lytA* y 3' de *ply* de *S. pneumoniae* D39. En negro se encuentra resaltado el codón de terminación del gen *dinF*. Tanto *dinF* como *lytA* y *ply*, se transcriben a partir de la banda complementaria a la incluida en las BD.

A continuación, se determinó si esta secuencia de 104 pb se encontraba conservada en otras especies relacionadas filogenéticamente con neumococo. Se observó que: 1) en *S. pseudopneumoniae* IS7493, que contiene un gen *lytA* de tipo bacteriano, existen dos copias de dicha secuencia en posiciones equivalentes a las encontradas en neumococo. De hecho, todos los estreptococos estudiados hasta el momento que contienen *lytA* bacteriana, también contenían *ply* y dos copias de la secuencia conservada; 2) en cepas de *S. mitis* carentes de *lytA* de tipo bacteriano (por ejemplo, la cepa *S. mitis* B6) hay sólo una copia (con un 94% de identidad,

respecto de D39) que solapa, como en neumococo, con el codón de terminación de *dinF* (Denapaité *et al.*, 2010). Se comprobó que todos los estreptococos estudiados hasta el momento que no contienen *lytA* de tipo bacteriano, tampoco contienen *ply* y presentan únicamente una copia de la secuencia conservada; 3) en *S. oralis* Uo5 esta secuencia también existe pero está interrumpida por un elemento BOX (Box_CA; 107 pb) (Martin *et al.*, 1992; Knutsen *et al.*, 2006); 4) no parece haber semejanzas relevantes en otras especies de estreptococos viridans (grupos Mitis, Anginosus y Salivarius). No obstante, un análisis detallado de la región 3' de *dinF* (incluyendo el codón de terminación de éste y el de iniciación del siguiente gen) arrojó resultados adicionales (Fig. 29). En los estreptococos que carecen de un gen *lytA* de tipo bacteriano, la distancia entre la secuencia conservada de 104 pb y el codón de inicio de la siguiente ORF es mucho menor que en los estreptococos que sí presentan un gen de este tipo (40 pb frente a 319 pb). En los estreptococos que carecen de gen *lytA* bacteriano, sólo el 54.8% (57/104) de los nucleótidos de la secuencia estaban conservados entre las distintas especies de SMG, mientras que en los estreptococos que sí presentaban gen *lytA* bacteriano se encontraban conservados hasta un 82.7% (86/104). Esto indica que hay una transmisión ancestral de estas secuencias como un cluster de genes, vertical (por especiación o diversificación en linajes) u horizontalmente (por adquisición de material genético externo).

Seguidamente, se calculó la distancia entre las secuencias repetidas en aquellos genomas de neumococo que están completos así como en los genomas incompletos de SMG en los que los genes *ply* y *lytA* se encuentran incluidos en el mismo *contig* (Tabla 24). Los resultados indicaron que, en neumococo, hay dos grupos de cepas, unas en las que la distancia es ≈ 10 kb y otras en las que es el doble (con la notable excepción de A45 que será analizada más adelante). Entre los SMG, en *S. pseudopneumoniae* la distancia es ≈ 10 kb y en las cepas de *S. mitis* SK597 y SK1080 de ≈ 5 kb (véase más adelante).

A

S. mitis

B6	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
NCTC 12261	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
11/5	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
13/39	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
17/34	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
18/56	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
29/42	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
F0392	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
SK95	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
SK321	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
SK569	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
SK575	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
SK579	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA
SK616	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTCTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGAA

S. oralis

Uo5 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT**AACACAAGT**TTTTTCGA
ATCC 35037 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT**AACACAAGT**TTTTTCGA
ATCC 49296 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT**AACACAAGT**TTTTTCGA
SK10 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT**AACACAAGT**TTTTTCGA
SK100 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT**AACACAAGT**TTTTTCGA
SK313 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT**AACACAAGT**TTTTTCGA

S. infantis

ATCC 700779 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTTACATTTTAATCTTTCTATTAT**AACACAAGTCTAGTCGA**
X **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTTACATTTTAATCTTTCTATTAT**AACACAAGTCTAGTCGA**

S. tigurinus

AZ 3A **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTTCCTATTAT**AACACAAGTGTAGCTGA**
1366 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTTCCTATTAT**AACACAAGTTTTTTCGA**
2425 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTTCCTATTAT**AACACAAGTTTTTTCGA**
2426 **CAT**TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTTCCTATTAT**AACACAAGTTTTTTCGA**

Streptococcus sp.

F0407	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA
GMD1S	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA
GMD2S	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA
GMD4S	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA
GMD6S	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA
SK643	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA
SPAR10	CAT	TAGGAATCTCCTTTTTTCACATTTTAATCTTCTTATTAT	AACACAAGTTTTTTCGGA

B6	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
NCTC 12261	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
11/5	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
13/39	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
17/34	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
18/56	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
29/42	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
F0392	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK95	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK321	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK569	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK575	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK579	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK616	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
Uo5	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	TTATACTCAATGAAATCAAAGAGCAAAC TAGG
ATCC 35037	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
ATCC 49296	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	TTATACTCAATGAAATCAAAGAGCAAAC TAGG
SK10	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK100	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK313	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
ATCC 700779	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
X	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
AZ 3A	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
1366	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
2425	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
2426	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
F0407	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
GMD1S	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
GMD2S	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
GMD4S	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
GMD6S	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SK643	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	
SPAR10	TTTTCACTAGAGGAAATGGATTTTATT	

RESULTADOS

B6	-----	-----
NCTC 12261	-----	-----
11/5	-----	-----
13/39	-----	-----
17/34	-----	-----
18/56	-----	-----
29/42	-----	-----
F0392	-----	-----
SK95	-----	-----
SK321	-----	-----
SK569	-----	-----
SK575	-----	-----
SK579	-----	-----
SK616	-----	-----
Uo5	-----	-----
ATCC 35037	-----	-----
ATCC 49296	-----	-----
SK10	-----	-----
SK100	-----	-----
SK313	-----	-----
ATCC 700779	-----	-----
X	-----	-----
AZ 3A	-----	-----
1366	-----	-----
2425	-----	-----
2426	-----	-----
F0407	-----	-----
GMD1S	-----	-----
GMD2S	-----	-----
GMD4S	-----	-----
GMD6S	-----	-----
SPAR10	-----	-----
SK643	-----	-----
AAGCTAGCCGCAGGCTGTACTTGAGTACGGCAAGACTAAGCTGACACGGTTTGAATTTGA		
B6	-----	-----
NCTC 12261	-----	-----
11/5	-----	-----
13/39	-----	-----
17/34	-----	-----
18/56	-----	-----
29/42	-----	-----
F0392	-----	-----
SK95	-----	-----
SK321	-----	-----
SK569	-----	-----
SK575	-----	-----
SK579	-----	-----
SK616	-----	-----
Uo5	-----	-----
ATCC 35037	-----	-----
ATCC 49296	-----	-----
SK10	-----	-----
SK100	-----	-----
SK313	-----	-----
ATCC 700779	-----	-----
X	-----	-----
AZ 3A	-----	-----
1366	-----	-----
2425	-----	-----
2426	-----	-----
F0407	-----	-----
GMD1S	-----	-----
GMD2S	-----	-----
GMD4S	-----	-----
GMD6S	-----	-----
SPAR10	-----	-----
SK643	-----	-----
TACCAAAATCAGCTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGTAAATCAACTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGTAAATCAACTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TACCAAAATCAGCTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGTAAATCAACTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TACCAAAATCAGCTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGTAAATCAACTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TCTTAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGTAAATCCAGCTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGTAAATCCAGCTAGGATTGCACCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TACGAAATCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TACGAAATCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTTTTCGAAGAGTATTACGAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTTTTCGAAGAGTATTACGAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTATAAATCAAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTATAAATCAAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
TTTTTAAATCAAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
CAGCAAAATCCAGCTAGGATTGCCTTTCTTGCCAAGATGACCTTG		
* * * * *		

```

B6 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGATAGTCATGGCAACC
NCTC 12261 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
11/5 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
13/39 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
17/34 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
18/56 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
29/42 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
F0392 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
SK95 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
SK321 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGATGGTCATGGCAACC
SK569 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATAGTCATGGCAACC
SK575 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATAGAGTTGAATGGTCATGGCAACC
SK579 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGAATGGTCATGGCAACC
SK616 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGATGGTCATGGCAACC
Uo5 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
ATCC 35037 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
ATCC 49296 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
SK10 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
SK100 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
SK313 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
ATCC 700779 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
X CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
AZ 3A CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
1366 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
2425 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
2426 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTAGTCATGGCAACC
F0407 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
GMD1S CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
GMD2S CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
GMD4S CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
GMD6S CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
SK643 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
SPAR10 CCTTCTTTTATCAAAGGGTGACGAAACAGTGAGAAATACAGTTGGGTGGTCATGGCAACC
** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

RESULTADOS

B

S. pseudopneumoniae

IS7493 CATATTCTACTCCTTATCAATTAACAACACTTATTTTACAAATCCAGAGCTAGAAACTC
BAA-960 CATATTTTACTCCTTATCAATTAACAACACTTATTTTACAAATCCAGAGCTAGAAACTC
SK674 CATATTTTACTCCTTATCAATTAACAACACTTATTTTACAAATCCAGAGCTAGAAACTC

S. mitis

SK564 CATATTCTACTCCTTATCAATTAAGACAACACTTATTTTACAAATCCAGAACCAGAAACTC
SK597 CATATTCTACTCCTTATCAATTAACAACACTCATTTTTACAAATCCAGAACCAGAAACTC
SK1080 CATATTCTACTCCTTATCGATTAAGACAACACTCATTTTTACAAATACAGAATCAGAAACTC

IS7493 CTTTATTTCTACCTTACAAAGAAGACAATCCTAGTCACGATTAGGCTTGTAGATAGAACT
BAA-960 CTTTATTTCTACCTCATAAAGAATACAATCCTAGTCACGATTGGGCTTGTAGATAGAACT
SK674 CTTTATTTCTACCTCATAAAGAATACAATCCTAGTCACGATTGGGCTTGTAGATAGAACT
SK564 CTTTATTTCTACCTTACAAAGAAGACAATCCTAGTCACGATTAGGCTTGTAGATAGAACT
SK597 CTTTATTTCTACCTCATAAAGAATACAATCCTAGTCACGATTGGGCTTGTAGATAGAACT
SK1080 CTTTATTTTATACCTTGCAAGAAGACAATCCTAGTCACGATTAGGCTTGTAGGTAGAACT

IS7493 TCAAAACGCACATTTTTGACACTGTAAATAGGACTGATAAGGTTTGCATTCTATCTACAA
BAA-960 TCAAAACGCACATTTTTGACACTGTAAATAGGACTGATAAGGCTCTGCATCCTATCTACAA
SK674 TCAAAACGCACATTTTTGACACTGTAAATAGGACTGATAAGGCTCTGCATCCTATCTACAA
SK564 TCAAAACGCACATTTTTGACACTGTAAATAGGACTGACAAGGCTCTGCATTCTATCTACAA
SK597 TCAAAACGCACATTTTTGATACGTGTAAATAGGACTGACAAGGCTCTGCATTCTATCTACAA
SK1080 TTAACACGCACATTTTTGACACTGTAAATAGGACTGGCAAGATCTGCATTCTATCTACAA
* *****

IS7493 TAACACCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTT
BAA-960 TAACACCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTT
SK674 TAACACCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTT
SK564 TAACACCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTT
SK597 TAACACCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTT
SK1080 TAACACCCAGACTAAAAAGCTTTTCAAAGTATATTTTACAGTCTCTATATGTCCTTT

IS7493 TCATAAACTACTATACTTTATTATATCATATAAAAAGAAGTCAAAGTATATTAACATATT
BAA-960 TCATAAACTACTATACTTTATTATATCATATAAAAAGAAGTCAAAGTCTGTTAAACTATT
SK674 TCATAAACTACTATACTTTATTATATCATATAAAAAGAAGTCAAAGTCTGTTAAACTATT
SK564 TCATAAACTACTATACTTTATTATATCATATAAAAAGAAGTCAAAGTCTGTTAAACTGTT
SK597 TCATAAACTACTATACTTTATTATATCATATAAAAAGAAGTCAAAGTCTGTTAAACTATT
SK1080 TCATAAACTACTATACTTTATTATATCATATAAAAAGAAGTCAAAGTCTATTAACATATT

IS7493 TCAAGACCAAACCTAAAGATGACAGCACAAAGTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGAT
BAA-960 TCAAGACCAAACCTAAAGATAACAGCACAAAGTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGAT
SK674 TCAAGACCAAACCTAAAGATAACAGCACAAAGTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGAT
SK564 TCAAGACCAAACCTAAAGATGACAGCACAAAGTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGAT
SK597 TCAAGACCAAACCTAAAGGAGAGAACACAAAGTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGAT
SK1080 TCAAGACCAAACCTAAAGAGGAGAACACAAAGTTTTTTCGATTTTCACTAGAGGAAATGGAT

IS7493 TTTATTCAGTAAATCAGCTAGGATGACACTTTTGTGCCAAGATGGCCTTCCTTCCTTT
BAA-960 TTTAT-TAGCAAAATCAGCTAGGAGAGCACTTTGGTTGCCAAGATGGCCTTCCTTCCTTT
SK674 TTTAT-TAGCAAAATCAGCTAGGAGAGCACTTTGGTTGCCAAGATGGCCTTCCTTCCTTT
SK564 TTTATTCAGCAAAATCAGCTAGGATGCTACTTTTGTGCCAAGATTTCCTTGCCTTCCTTT
SK597 TTTATTTAGCAAAATCAGCTAGGATGCTACTTTTGTGCCAAGATTTCCTTGCCTTCCTTT
SK1080 TTTATTCAGTAAATCAGCTAGGATGACACTTTTGTGCCAAGATGGCCTTCCTTCCTTT

IS7493 TATCAAGGGGTGACGGAAGCGAAAGTACAGTTGAAGTGTGATGGCAACC
BAA-960 TATCAAGGGGTGACGGAACAGTGAGAAGTACAGTTGGATGGTCATGGTAACC
SK674 TATCAAGGGGTGACGGAACAGTGAGAAGTACAGTTGGATGGTCATGGTAACC
SK564 TATCAAGGGGTGACGGAATAATGAGAAGTACAGTTGAAGTGTGATGGCAACC
SK597 TATCAAGGGGTGACGGAACAGTGAGAAATAAGTTGAATGGTCATGGCAACC
SK1080 TATCAAGGGGTGACGGAATAGTGAGAAGTACAGTTGGATGGTCATGGCAACC

Fig. 29. Alineamientos de la zona comprendida entre *dinF* y la ORF localizada inmediatamente en posición 3' de ella. La orientación de las secuencias mostradas corresponde a la de la cepa D39 de neumococo. En negrita sobre fondo negro se muestran los nucleótidos que coinciden con la copia de la secuencia repetida localizada en el extremo 3' de *dinF* en la cepa D39 de neumococo. Los asteriscos indican aa idénticos en todas las secuencias. (A) Cepas de SMG carentes del gen *lytA*. En dos cepas de *S. oralis* la secuencia BOX se indica en fondo gris (Box_A en gris claro y Box_C en fondo oscuro). Los guiones representan espacios introducidos para optimizar el alineamiento. Los codones de terminación de *dinF* y de iniciación del siguiente gen están indicados en fondo rojo y verde, respectivamente. (B) Cepas de SMG que contienen un gen tipo *lytA*. El codón de iniciación de éste se resalta en fondo verde y el de terminación de *dinF*, en fondo rojo. En el recuadro se encuentra señalado la caja -10 extendida (Sabelnikov *et al.*, 1995) del promotor de *lytA*.

A continuación, se analizaron las zonas adyacentes a los genes *lytA* y *ply* con objeto de conocer en detalle su estructura nucleotídica y poder profundizar en el origen/transmisión de estos genes (Fig. 30A). Por lo que respecta a los genes situados en posición 5' de *lytA*, la conservación resulta notable ya que, al menos, los cuatro genes más próximos se conservan en orden, dirección de transcripción y secuencia (*lytR*→*cinA*→*recA*→*dinF*) incluso en aquellas cepas que no contienen un gen *lytA* de tipo bacteriano. Sólo en *S. oralis* Uo5, los genes *recA* (SOR_1705) y *dinF* (SOR_1702) están separados por dos pequeños ORFs de función desconocida. Por otro lado, el grado de conservación de las secuencias de los genes localizados en posición 3' de *dinF* (o de *ply* en los genomas que lo contienen) no es tan fácil de reconocer si se atiende a las anotaciones incluidas en las BD. El número, secuencia y tipo de genes varía notablemente de unas cepas a otras. Ello parece ser debido a la existencia de numerosas ISs (o parte de ellas) así como de mutaciones puntuales (incluidas inserciones y deleciones) que interrumpen prematuramente algunos ORFs. Por ello, en la Fig. 30A se muestra la estructura de esta región genómica pero atendiendo exclusivamente a la secuencia de nucleótidos, pudiéndose observar que esta región está muy conservada en todos los casos, al igual que se ha descrito para la zona 5' de *dinF*.

RESULTADOS

Tabla 24. Distancias (en bp) entre las secuencias repetidas en distintas cepas

Estirpe	Coordenadas		Distancia (kb) ^a
	3' de <i>ply</i>	5' de <i>lytA</i>	
<i>S. pneumoniae</i>			
670-6B	1 867 928–1 868 034	1 886 990–1 887 093	19.1
70585	1 844 573–1 844 679	1 854 569–1 854 639	10.0
AP200	1 814 791–1 814 897	1 825 038–1 825 141	10.2
ATCC 700669	1 888 661–1 888 762	1 899 314–1 899 417	10.6
CGSP14	1 882 782–1 882 888	1 892 807–1 892 877	10.0
D39	1 720 617–1 720 723	1 730 877–1 730 980	10.3
G54	1 748 981–1 749 087	1 759 593–1 759 686	10.6
gamPNI0373	1 748 098–1 748 190	1 758 305–1 758 408	10.2
Hungary19A-6	1 902 156–1 902 262	1 921 838–1 921 931	19.7
INV104	1 817 065–1 817 171	1 827 081–1 827 184	10.0
INV200	1 770 745–1 770 851	1 780 770–1 780 840	10.0
JJA	1 793 043–1 793 149	1 803 031–1 803 124	10.0
OXC141	1 720 843–1 720 949	1 730 872–1 730 975	10.0
P1031	1 794 517–1 794 623	1 804 545–1 804 648	10.0
R6	1 713 086–1 713 192	1 723 345–1 723 438	10.2
A45	286 342–286 236	283 620–283 517	2.7
ST556	1 790 807–1 790 914	1 810 098–1 810 191	19.3
Taiwan19F-A	1 757 299–1 757 405	1 776 588–1 776 681	19.3
TCH8431/19A	1 977 112–1 977 218	1 996 426–1 996 519	19.3
TIGR4	1 831 056–1 831 162	1 841 681–1 841 774	10.6
<i>S.pseudopneumoniae</i>			
IS7493	1 853 218–1 853 325	1 863 791–1 863 892	10.5
<i>S. mitis</i> ^b			
SK597	12 456–12 363	7 330–7 227	5.1
SK1080	242 620–242 528	237 499–237 396	5.1

^a Distancias aproximadas entre el centro de las respectivas repeticiones.

^b En estas cepas, las coordenadas corresponden, no a las de los genomas completos sino a *contigs* individuales. Para SK597 y SK1080 los Nos. de acceso son AEDV01000001 y AFQV01000006, respectivamente.

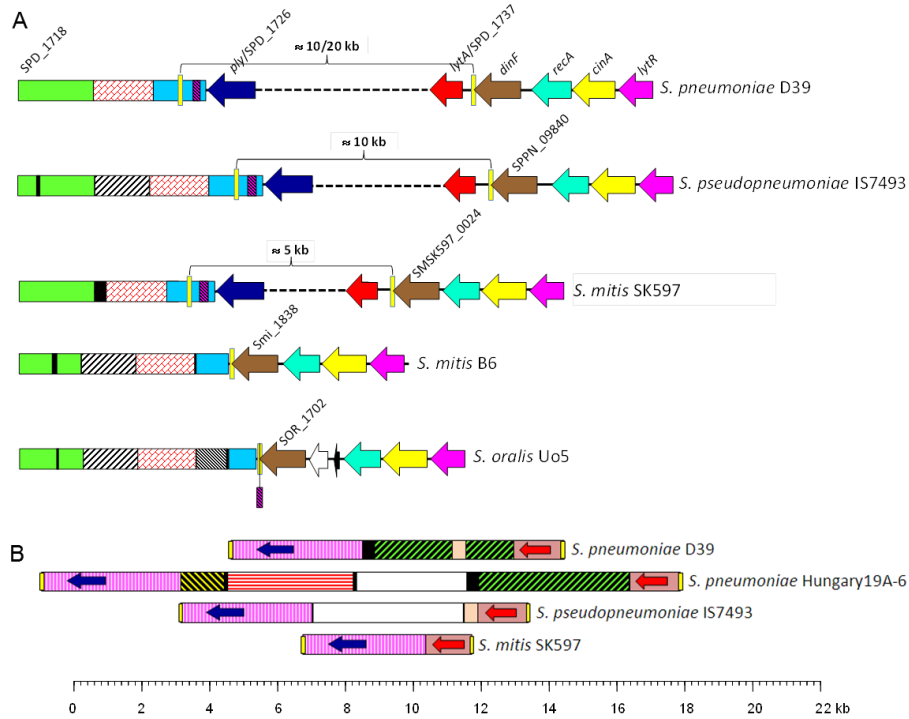
En lo que respecta a la región flanqueada por *lytA* y *ply* y, más concretamente, la comprendida entre las dos secuencias repetidas, ya se ha mencionado el hecho de

que dicha región parece ser de ≈ 5 kb o múltiplos de esta cifra. De hecho, el alineamiento de las correspondientes secuencias nucleotídicas (ya que los ORFs anotados en esta región poseen el mismo grado de irregularidad que las ya comentadas para las situadas en el 3' de *dinF*, o *ply* en su caso) indica la existencia frecuente de fenómenos de recombinación mediados por ISs que han causado cambios del tamaño de esta región genómica. Además de la existencia de ISs (o partes de las mismas) aún reconocibles, es notable la existencia de una región (rayada horizontalmente en la Fig. 30B) que posee genes con $\geq 98\%$ de identidad respecto a SPD_1606/1607/1608/1609 del genoma de la cepa D39, lo que sugiere un fenómeno de transposición. De hecho, según la BD ISfinder (Siguier *et al.*, 2006), este conjunto de cuatro genes se encuentra flanqueado por sendas copias de ISSpn7 en la cepa Hungary19A-6 de neumococo. Además, la única zona con similitud reconocible en otra porción de la misma región (rectángulo amarillo rayado en negro en la cepa Hungary19A-6) comparte un 66% de identidad sobre 900 nt con un ORF (SSUD9_1117) de *Streptococcus suis* D9.

Finalmente, se estudió el caso de la cepa *S. pneumoniae* A45 en el que las dos copias directas de la secuencia repetida se encuentran separadas por sólo 2.7 kb (Tabla 24). En realidad, en esta cepa, los genes *lytA* y *ply* se encuentran parcialmente deletados (aquel en su porción 3' y éste en la 5') y fusionados, para dar lugar a un nuevo gen que potencialmente codificaría una proteína híbrida, donde además se han perdido todos los ORFs normalmente presentes entre dichos genes (Fig. 31). En concreto, en A45, se observan una serie de variaciones respecto al patrón común del resto de genomas secuenciados de neumococo: 1) *lytA* ha sufrido una mutación (G \rightarrow T; posición 284 081 del genoma de A45) que cambia un codón GAA a TAA (Glu48Fin) interrumpiéndose así la traducción de la NAM-amidasa; 2) La parte no deletada del gen *ply* se encuentra unida en fase a *lytA* formando así un ORF que potencialmente codificaría una proteína híbrida. El primer residuo de esta proteína híbrida, anotada en las BD como *thiol-activated cytolysin*, sería la metionina que habitualmente se encuentra en la posición 62 en el resto de las NAM-amidasas funcionales (Fig. 31). En conjunto, el gen híbrido corresponde a *lytA* entre las posiciones 283 940–284 536 y a *ply* entre 284 537–285 502 del genoma de A45 y la proteína potencial que codificaría (459 aa) contendría 138 aa de LytA (entre los residuos 62 y 199 de LytA de la cepa D39; 318 aa) y 321 de Ply (entre los residuos 151 y 471 de Ply de la cepa D39; 471 aa); 3) en la Fig. 32 se muestra que la cepa A45 de neumococo ha sufrido una profunda reorganización

RESULTADOS

de su genoma con respecto al resto de cepas cuyos genomas completos se encuentran en las BD y que han sido detalladas más arriba.



A

```

283921 AATTGATAAGGAGTAGAATATCGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTCCTCA
283981 AGTCGGCGTGCAACCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAAC
284041 CGTACAGAAATGAAGCGGATTATCACTGGCGGAAAGACCCATTAATTAGGTTTTTCTCGCA
284101 CATTGTTGGGAACGGTTGCATCATGTCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACGT
284161 TGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCATTCAAC
284221 TAAAGAAGAGTTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGCAATCTAGCAGA
284281 TGAAGCAGGTTTGCAGAAACGCTTGATACAGGGAGTTAGCTGGAATTAAGACGCACGA
284341 GTATTGCACGAATAACCAACCAACCACTCAGACCATGTGGATCCATACCCCTTACTT
284401 GGC AAAATGGGCAATTAGCCGTGAGCAGTTTAAGCATGATATTGAGAACGGCTTGACGAT
284461 TGA AACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTGGCTACTGGTACGTACATTGAGACGGCTCTTA
284521 TCCAAAAGACAAGTTTGAAAAATCACGGCTCACAGCATGGAACAACCAAGGTCAAGTT
284581 TGGTCTTGACTTTGAAAAGACAGGGAATCTCTTGATATTGATTTAACTCTGCCATTCT
284641 AGGCGAAAAGCAGATTGAGATTGTTAATTTAAGCAGATTATTATACAGTCAGCGTAGA
284701 TGCTGTTAAAAATCCAGGAGATGTGTTCAAGTACTGTAAAGGTAGAGGATTAAAAACA
284761 GAGAGGAATTTCTGCAGAGCGTCTTTGGTCTATATTCGAGTGTGCTTATGGGCGCCA
284821 AGTCTATCTCAAGTTGGAACACGAGTAAGAGTGATGAAGTAGAGGCTGCTTTGAAGC
284881 TTTGATAAAAAGGAGTCAAGGTAGCTCCTCAGACAGAGTGAAGCAGATTTTGGACAATAC
284941 AGAAGTGAAGCGGTTATTTAGGGGCGACCAAGTTCGGGTGCCGAGTTGTAAACAGG
285001 CAAGGTGGATATGGTAGAGGACTTGATTCAAGAAGGCAGTCGCTTTACAGCAGATCATCC
285061 AGGCTTGCCGATTCTTATACAACCTCTTTTACGTGACAATGTAGTTCGACCTTTCA
285121 AAACAGTACAGACTATGTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACGGAGATTACTGCT
285181 GGATCATAGTGGTGCTATGTTGCCCAATATTATATTACTGGGATGAATTATCCTATGA
285241 TCATCAAGGTAAGGAAGTCTTGACTCCTAAGGCTGGGACAGAAATGGGCAGGATTGAC
285301 GGCTCACTTTACCACTAGTATCTCTTTAAAGGGAATGTTGTAATCTCTCTGTCAAAAT
285361 TAGAGAGTGTACCGGCTTGCTGGGAATGGTGGCGTACGGTTTATGAAAAACCGATT
285421 GCCACTAGTCGTAGCGGACGATTTCTATTGGGGAACAACCTCTATCTCAGGTAGA
285481 AGATAAGGTAGAAAATGACTAG

```

B

```

MQVGPVDNGAWDVGWNAETAAVELIESHSTKEEFMTDYRLYIELLRNLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVD
PYPYLAKWGISREQFKHDIENGLTIETGWQKNDTGYYVHSDGSYPKDKFEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEK
QIQIVNFKQIYYTVSDAVKNPGDVFQDPTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDEVEAAFEALIKGVKVPQT
EWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSLRDNVVFQNSTDYVETKVTAYRNGDLL
LDHSGAYVAQYYITWDELSYDHQGEVLTPKAWDRNGQDLTAHFTTISIPKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVVEKTDLPVLRKRT
ISIWGTTLYPQVEDKVEN

```

Fig. 31. Secuencia de nucléotidos (A) y la deducida de aminoácidos de la proteína híbrida LytA-Ply (B) codificada por la cepa A45 de *S. pneumoniae* (SPNA45_00270). La parte sombreada corresponde al gen *lytA* (panel A) o la NAM-amidasa LytA (panel B). Sobre fondo negro se resaltan los codones de inicio de *lytA* y el codón de terminación prematuro. Los codones de inicio y terminación predichos para la proteína de fusión se encuentran subrayados y en negrita.

RESULTADOS

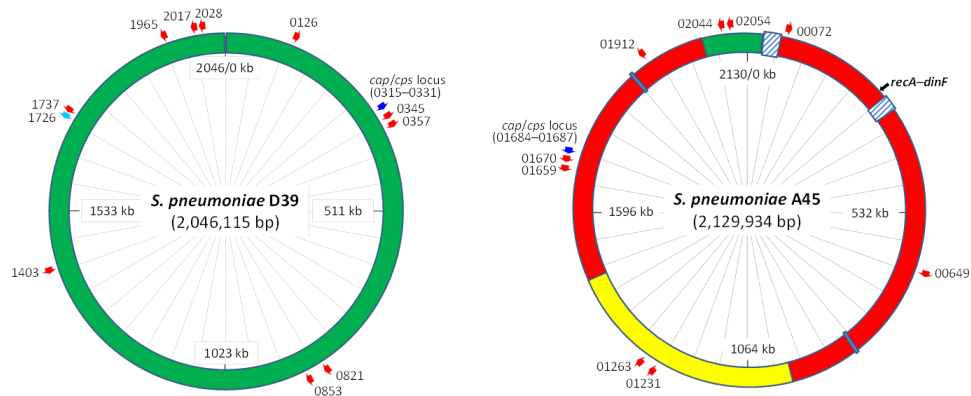


Fig. 32. Representación esquemática de los genomas de las cepas de neumococo D39 y A45. Aunque el tamaño de ambos genomas es similar, su organización es muy diferente. La localización de los genes que codifican diversas CBP y su dirección de transcripción se indican con flechas rojas. En azul oscuro se muestra la posición del locus capsular y, en azul claro, la del gen *ply*. Los genes se identifican por su orden de locus en D39 (prefijo SPD_)/A45 (prefijo SPNA45_) y corresponden a los siguientes: 0126/01912 (*pspA*); 0345/01670 (*cbpC*); 0357/01659 (*cbpF*); 0821/01231 (*cbpE*); 0853/01263 (*lytB*); 1403/00649 (*lytC*); 1726/- (*ply*); 1737/- (*lytA*); 1965/00072 (*pcpA*); 2017/02044 (*cbpA*); 2028/02054 (*cbpD*). Los ORFs SPNA45_01659 y SPNA45_01670 parecen corresponder a pseudogenes. En el genoma de A45 los fragmentos genómicos invertidos con respecto a D39 se indican en rojo y los que ocupan una posición diferente (pero sin inversión), en amarillo. Las barras azules corresponden a profagos tanto enteros (barras rayadas) como defectivos.

V. DISCUSIÓN

1. POLIMORFISMO DEL GEN *LYTA* EN ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO MITIS Y SUS FAGOS

S. pneumoniae constituye actualmente la principal causa de otitis media aguda, sinusitis, neumonía y meningitis. Como ya se ha comentado anteriormente, esta bacteria posee una potente autolisina, la NAM-amidasa *LytA*, considerada como un importante factor de virulencia (Berry y Paton, 2000; Ng *et al.*, 2002; Orihuela *et al.*, 2004; Hirst *et al.*, 2008) y que es la responsable de la lisis celular en presencia de Doc 1% (uno de los tres test de referencia utilizados en los laboratorios clínicos para la identificación de neumococo) (Howard y Gooder, 1974). El gen que codifica esta amidasa, *lytA*, no es exclusivo de neumococo y se ha encontrado en otras cepas de SMG así como en sus profagos (Díaz *et al.*, 1992a, b; Whatmore *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2004a; Llull *et al.*, 2006). Este gen está presente en todos los aislados clínicos humanos y fagos atemperados de neumococo analizados hasta el momento (es decir, forma parte de su genoma núcleo), por lo que debe cumplir alguna función esencial para la fisiología de esta bacteria. Sin embargo, *lytA* no está presente en todas las cepas del resto de especies de SMG por lo que su función, en estos casos, podría ser accesorio. Estos SMG, así como los fagos atemperados, estarían actuando como una importante fuente de variabilidad de *lytA*. En esta Tesis se ha explorado la variabilidad alélica, tanto del gen *lytA* como de la proteína que codifica, debido a que este polimorfismo posee una especial relevancia por sus implicaciones patológicas y diagnósticas derivadas de lo anteriormente expuesto. Este estudio comenzó con un análisis preliminar de la variabilidad alélica presente entre los alelos *lytA* disponibles en las BD para, posteriormente, ser ampliado con un mayor número de cepas de neumococo y de SMG, así como de sus profagos. Para ello, lo primero que se hizo fue una búsqueda en las BD y se encontraron un total de 26 alelos *lytA*_{Spn} y 23 *lytA*_{SMG}, ampliando así el número de alelos publicados por Llull *et al.* (2006). Además, se encontraron 19 alelos *lytA*_{PPH} y únicamente 3 *lytA*_{SPH}. Con el fin de disponer de una clasificación más unificada de todos los alelos *lytA*, se asignó a los alelos *lytA*_{Spn} y *lytA*_{SMG} una nueva denominación [respecto de la de Llull *et al.* (2006)], que incluía los diferentes alelos *lytA*_{PPH} y *lytA*_{SPH} que, hasta ese momento, no habían sido clasificados (Tabla 13). Al realizar un alineamiento de los alelos *lytA*_{Spn}, *lytA*_{SMG} y *lytA*_{PPH} cuya secuencia completa estaba disponible, se observó que los alelos *lytA*_{Spn} presentan un menor polimorfismo que los alelos *lytA*_{SMG} y mucho menor que los *lytA*_{PPH} (Fig. 3). Además, en el caso de los alelos *lytA*_{SMG} y

lytA_{PPH}, el polimorfismo se distribuye a lo largo de todo el gen mientras que, en los alelos *lytA_{Spn}*, se concentra esencialmente alrededor de tres posiciones nucleotídicas (453, 767 y 923), en particular cerca de la primera de ellas (Fig. 1). Es bien conocido el hecho de que los genes fágicos evolucionan más rápidamente que los bacterianos (Abedon y Lejeune, 2005; Abedon, 2009), por lo que no resulta sorprendente que los fagos presenten un grado de polimorfismo mayor que el de las bacterias. En cambio, el reducido polimorfismo de los alelos de neumococo frente a los alelos de SMG, sugiere que éstos últimos se adquirieron antes —en términos evolutivos— y/o que las cepas de *S. pneumoniae* se encuentran mucho más estrechamente relacionadas entre sí que el conjunto constituido por los otros SMG, como ya ha sido propuesto (Bishop *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2009; Hanage *et al.*, 2009). Curiosamente, el alto grado de polimorfismo génico alrededor de la posición 453 no se ve reflejado en la estructura primaria de la proteína (es decir, todas las sustituciones fueron sinónimas) lo que sugiere que la estructura/función de esta región está sometida a una intensa presión selectiva (Nielsen, 2005).

Los alelos *lytA_{Spn}* se han clasificado en dos familias (Fam_A y Fam_B) en función del polimorfismo de la región situada alrededor del nt 453 (Fig. 1C). En el caso de los alelos *lytA_{SMG}*, sin embargo, esta división no fue posible pudiéndose observar que esta región difiere considerablemente de la equivalente en los alelos *lytA_{Spn}* (Fig. 4). Mientras que dos de los alelos fágicos (*lytA_{15_PPH}* y *lytA_{2_SPH}*) presentaban secuencias nucleotídicas idénticas a las consenso de Fam_A y Fam_B, respectivamente, la mayoría del resto de alelos fágicos presentaban una combinación de ambas. De acuerdo con Feil (2004), en los alineamientos de secuencias se pueden detectar a simple vista eventos de recombinación recientes, particularmente si los reemplazos son lo suficientemente pequeños como para localizar los puntos de ruptura. Este hecho se ha documentado en el mosaicismo presente en los genes de neumococo que codifican las proteínas de unión a penicilina (Dowson *et al.*, 1990), la subunidad beta de la ARN polimerasa de cepas resistentes a rifampicina (Ferrándiz *et al.*, 2005) o las ADN topoisomerasas de aislados resistentes a fluoroquinolonas (Frias *et al.*, 2009; Balsalobre *et al.*, 2013). Los descendientes de un clon concreto que difieren en uno de los siete genes analizados en el MLST se denominan SLVs (*single locus variants*). La aparición de las variantes alélicas en los SLVs se ha atribuido a mutaciones puntuales —si éstas difieren del alelo ancestral en un único nt— mientras que las variantes que difieren en múltiples nt (o sólo en uno pero que está presente en linajes no relacionados) se han atribuido a eventos de re-

combinación (Feil, 2004). Continuando con este criterio, el polimorfismo de la región situada alrededor del nt 453 de *lytA* sugiere poderosamente la existencia de eventos de recombinación entre el gen de los profagos y del hospedador; como es el caso particular de las cepas CGSP14 (*lytA*_{20_Spn}, Fam_A) y SP14-BS69 (*lytA*_{22_Spn}, Fam_B), ambas con serotipo 14 y ST124. Estos dos alelos difieren únicamente en 13 posiciones, 10 de las cuales están localizadas entre las posiciones 441 y 465 (región polimórfica que determina el tipo de familia a la que pertenece ese alelo *lytA*), y sólo tres posiciones (264, 282, 567) a ambos lados de dicha región. Además, estos eventos de recombinación parecen haber tenido lugar más de una vez ya que los mismos alelos están presentes en aislados que no se encuentran estrechamente relacionados (Fig. 5).

De todos los alelos *lytA*_{Spn} cuya secuencia completa se conocía en el momento en el que se realizó este estudio, el gen *lytA* del profago ϕ Spn_670_1 (*lytA*_{15_PPH}) era el que presentaba mayor similitud (92% de identidad; PED, 7.76%) con el gen *lytA* de su cepa hospedadora (*lytA*_{5_Spn}). Ambos alelos eran idénticos entre las posiciones 343 y 495 y desde la posición 497 hasta el final del gen, mientras que el alelo *lytA*_{16_PPH} (correspondiente al segundo fago que presenta la cepa 670, ϕ Spn_670_2) sólo presentaba un 85% de identidad (PED, 16.33%) con el alelo *lytA*_{5_Spn} (Fig. 33A). Además, el gen *lytA* del profago ϕ HER de *S. mitis* (*lytA*_{2_SPH}) era muy similar (82% de identidad; PED, 20.12%) al gen de la NAM-amidasa (*lytA*_{16_Spn}) de la cepa de neumococo ST344 (Fig. 33B). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los fagos atemperados de SMG juegan un papel importante en la diseminación de *lytA* entre los estreptococos α -hemolíticos que comparten el mismo hábitat (Romero *et al.*, 2009b).

A

[illegible]

B

```

8888888899999999
44666670223455
09156731176907
16_SPN ATGGGATCCATGTA
2_SPH TCCAAGCATGAACG

```

136

transducción no ha sido claramente (Porter *et al.*, 1979). Hace más de 20 años, Romero *et al.* (1990a) mostraron evidencias directas de recombinación entre el gen tipo *lytA* de un profago de neumococo y el de su cepa hospedadora bajo condiciones de laboratorio, y, en 1999, se propuso la posibilidad de que hubieran tenido lugar eventos de recombinación *in vivo* entre los genes *lytA* fágicos y bacterianos (Whatmore y Dowson, 1999). A pesar de ello y debido a que en aquel momento sólo se conocía un número reducido de alelos *lytA_{Spn}* —sólo un alelo *lytA_{PPH}* (el gen *hbl*, del profago HB-3) y otro alelo *lytA_{SPH}* (el gen *ejl*, del profago EJ-1)— únicamente pudieron obtenerse conclusiones muy preliminares. Los datos que se presentan en esta Tesis confirman y amplían estas observaciones previas e indican que las versiones fágicas de los genes bacterianos implicados en virulencia, como es el caso de *lytA*, no sólo aceleran la diseminación de dichos genes sino incluso su propia evolución. La conservación de la arquitectura de dominios, longitud e identidad de secuencia entre los genes *lytA*, tanto de bacterias como de fagos, así como su observada capacidad para recombinar, permite inferir que todos estos genes comparten un ancestro común y que, por tanto, el uso del término “homólogo” para referirse a ellos es adecuado. Sin embargo, con los datos actuales no se puede discernir si la NAM-amidasa codificada por los genes fágicos deriva de la bacteriana, o viceversa, como se había sugerido previamente para otros genes (Campbell, 1988).

A la vista de la información obtenida del estudio del polimorfismo de *lytA* y con la intención de indagar aún más en la evolución de este gen, se decidió ampliar el análisis para reunir la mayor colección posible de alelos *lytA*. Se actualizó una nueva búsqueda de alelos *lytA_{Spn}* en las BD y, simultáneamente, se suplementó con la secuenciación del gen de 164 aislados clínicos de neumococo con los serotipos 1, 3 o 19A. Con todo ello, el número total de alelos *lytA_{Spn}* diferentes caracterizados ascendió a 30 (dando lugar a 15 alelos *lytA_{Spn}*) (Tabla 14). Se clonaron y purificaron las proteínas con alelos *lytA_{1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 14_Spn}* para explorar si la variabilidad alélica afectaba a la actividad enzimática. Los ensayos de actividad lítica sobre paredes purificadas de neumococo, mostraron que los alelos *lytA_{7_Spn}* y *lytA_{14_Spn}* presentaban una actividad significativamente mayor que el alelo de referencia *lytA_{1_Spn}* (correspondiente a la cepa R6), mientras que el alelo *lytA_{8_Spn}* presentaba una actividad menor (Fig. 23). Como complemento a estos ensayos de actividad *in vitro*, se realizaron otros de actividad sobre cultivos bacterianos. Las diferencias de actividad entre alelos encontradas en los ensayos *in vitro* no se vieron reflejadas, sin embar-

go, en los ensayos de lisis sobre cultivos de la cepa de *S. pneumoniae* M32 (Δ lytA32) (Tabla 21). Esto podría ser, probablemente, a que, a partir de un nivel determinado de actividad, el ensayo microbiológico llega rápidamente a saturación y no es posible detectar diferencias, mientras que las condiciones de los ensayos *in vitro*, permiten un rango de linealidad más amplio; esto hace que ambas técnicas no sean comparables. Igualmente, las diferencias en la actividad de aquellos alelos frente a LytA_{1_Spn} podrían no haberse detectado en los ensayos sobre cultivos, ya que éstas, no eran demasiado notorias (entre 25 y 34%). Sin embargo, los ensayos realizados sobre cultivos de *S. oralis*, *S. mitis* y *S. infantis* mostraron que los alelos LytA_{6_Spn} y LytA_{8_Spn} no eran capaces de lisar estas cepas (Tabla 21). Este hecho sugiere que la estructura de las paredes de dichas especies no es la apropiada para que estos alelos puedan lisar correctamente, en particular el contenido de colina. Los ensayos de sensibilización a la lisis de los SMGs en presencia de Doc al 1% y los diferentes alelos LytA_{Spn}, no permitieron ver estas diferencias e incluso, en muchos casos, ni siquiera se observó lisis aunque sí autólisis del cultivo en la fase estacionaria. Una posible explicación a esta discrepancia sería que el tiempo de incubación del cultivo con la proteína (2 h) previo a la adición de Doc, no fuera suficiente para que ésta ocupara la localización idónea para llevar a cabo su actividad. Los alelos LytA_{6_Spn} y LytA_{8_Spn} muestran cambios conservativos de algunos residuos (Fig. 34) y, por ello, no parece probable que sean los responsables de dicha diferencia con el alelo LytA_{1_Spn}. Es posible que la combinación (o suma) de los diferentes cambios sea la razón de la incapacidad de estos alelos para lisar a *S. mitis*, *S. oralis* y *S. infantis*.

	1222223333
	360045550001
Alelo	162462364562
1_SPN	PHIGDNEARPED
3_SPN	:Y:::K:::
7_SPN	:Y::EDV:K:::
13_SPN	S:::K:::
14_SPN	S:::TK:::
2_SPN	:::K:::
4_SPN	::VDE::K:::
6_SPN	::VDE::KS:::
8_SPN	:::K:DE

Fig. 34. Alineamiento de la secuencia de aa de los alelos LytA_{Spn} utilizados en esta Tesis. Se muestran únicamente aquellas posiciones de aa en las que difieren unos alelos de otros. Las posiciones de aa se leen en vertical. Los dos puntos indican aa idénticos.

Para ampliar el número de alelos *lytA*_{PPH} descritos en el estudio preliminar, se procedió a analizar la presencia de profagos y su tipificación (mediante su gen *lytA*) en los 164 aislados clínicos de neumococo. Estudios previos indicaban que entre un 50% (Romero *et al.*, 2009b) y un 76% (Ramírez *et al.*, 1999) de los neumococos contienen profagos (defectivos o no). No obstante, el estudio llevado a cabo por Ramírez *et al.* (1999) podría estar sobrestimando la incidencia de profagos ya que se emplearon técnicas de hibridación del ADN de neumococo con una sonda de *lytA*, de tal manera que se podrían estar detectando no sólo bacteriófagos completos sino también “restos” fágicos. En el caso del trabajo de Romero *et al.* (2009b), se emplearon dos técnicas complementarias (PCR e inducción del ciclo lítico con mitomicina C) para tratar de eludir tales limitaciones. Por consiguiente, se decidió emplear las mismas técnicas que estos últimos autores para la detección de fagos completos. En términos globales, los resultados obtenidos sobre el porcentaje de contenido fágico, fueron similares a los del estudio anteriormente mencionado, determinándose que el 46% de los aislados fueron positivos en la PCR de detección de fago y que el 60% de los aislados positivos en dicha PCR contenían algún fago inducible. Mientras que el trabajo realizado por Romero *et al.* (2009b) incluía una diversidad bastante amplia en cuanto a serotipos y STs, el presente estudio se ha centrado en profundizar en los 3 serotipos (21 ST) que más frecuentemente causan enfermedad en España. Aun así, se han podido realizar ciertas comparaciones entre ambos estudios. En primer lugar, aunque sólo 2 de 10 de las cepas del serotipo 1 presentaban profago, dichas cepas pertenecían al ST306 (Romero *et al.*, 2009b). Curiosamente, sin embargo, en esta Tesis no se detectó profago alguno (con la PCR de detección de fago) en ningún aislado del serotipo 1, a pesar de haberse analizado un número de aislados muy superior al estudiado anteriormente (56 frente a 10), y correspondiendo 46 de esos aislados al ST306. La razón de esta discrepancia podría residir en que, en el trabajo presentado en esta Memoria, se hubieran analizado aislados de naturaleza clónica —ya que procedían de un hospital con atención a pacientes de un área geográfica muy concreta y reducida— mientras que, en el trabajo de referencia, los aislados se recogieron en una región más extensa por lo que, probablemente, muestren una variabilidad genómica mucho mayor a pesar de poseer el mismo ST. En segundo lugar, Romero *et al.* (2009b) detectaron la presencia de profagos en el 80% (12/15) de los aislados del serotipo 3 analizados, de los cuales el 88% (8/9) de los aislados de ST180 presentaban profago. En esta Tesis, sin embargo, se detectaron profagos en un 41% (23/56) de los aisla-

dos, de los cuales el 74% (20/27) de los aislados de ST180 presentaban profago y en el 96% (1/26) de los aislados de ST260 no se detectaba profago. Estas diferencias en cuanto al contenido fágico en aislados del serotipo 3 entre ambos trabajos podrían ser debidas, por un lado, al muy diferente número de aislados analizados (56 frente a 15) en uno y otro trabajo y, por otro, a que en el trabajo de referencia no se analizó ningún aislado de ST260, el cual se ha visto en esta Tesis que es un ST con una frecuencia de profagos muy baja. Con estas premisas se puede deducir que el estudio realizado en esta Tesis sobre la frecuencia fágica en aislados del serotipo 3 es más ajustado a la situación real que el anterior. Hay que destacar, no obstante, que en ambos trabajos se ha podido observar que la frecuencia de profagos en aislados de serotipo 3 y ST180 es bastante alta. Finalmente, Romero *et al.* (2009b) observaron una única cepa lisógena en los 6 aislados de serotipo 19A que analizaron. Contrariamente, el 98% (53/54) de los aislados examinados de dicho serotipo en el presente trabajo han resultado ser lisógenos. Nuevamente, aquellos autores analizaron un número más reducido de cepas (6 frente a 54 aislados) que correspondían a un único ST (ST199), mientras que en este trabajo se abarcaron hasta 14 STs diferentes, lo que resulta más adecuado a la visión amplia que requiere un serotipo genéticamente tan promiscuo como éste (Pillai *et al.*, 2009; Beall *et al.*, 2011; Tarragó *et al.*, 2011).

Considerando que todos los profagos de neumococo analizados hasta el momento presentaban un gen tipo *lytA*, se realizó un análisis de la presencia del gen *lytA* de tipo fágico (*lytA_{PPH}*) en los aislados clínicos antes mencionados utilizando una PCR específica para este tipo de gen. Para ello, se tomó una muestra de 56 aislados (independientemente de que se hubiera detectado profago o no) sobre los que se realizó la PCR correspondiente. El 92% de los aislados con fagos contenían el gen *lytA_{PPH}* según está técnica, mientras que sólo en el 28% de las cepas que no se lisaban con mitomicina C, se pudo amplificar dicho gen. Por otra parte, en el 31% de las cepas sin fagos detectables se observó amplificación del gen *lytA_{PPH}* (2 aislados de serotipo 1 y ST304, y 3 aislados de serotipo 3 y ST180). Estos aislados corresponderían, muy probablemente, a cepas con profagos defectivos ya que, en algunos de ellos, se pudo secuenciar el gen *lytA_{PPH}* y los alelos encontrados coincidieron con los encontrados en otras cepas que sí mostraron resultado positivo en la PCR de detección de fago. Alternativamente, podría tratarse de fagos completos pero diferentes a los descritos hasta ahora, aunque esto no se puede asegurar ya que no se realizó la prueba de inducción con mitomicina C. Como era de esperar,

con ambas PCR se estaría sobrestimando el número de fagos atemperados viables ya que casi el 28% (11/40) de las cepas positivas en la PCR de detección de fago no se lisaron en presencia de mitomicina C, incluso aunque en 9 de estas 11 cepas hubo amplificación de *lytA*_{PPH}. Posteriormente, se consiguió secuenciar el gen *lytA*_{PPH} del 71% de los aislados positivos en la PCR de *lytA*_{PPH}, en los que se encontraron 10 alelos no descritos hasta ese momento (numerados del *lytA*_{20_PPH} al *lytA*_{29_PPH}), todos ellos con un tamaño de 957 pb. Con estos alelos nuevos y los ya recogidos al principio de esta Memoria, se obtuvo la clasificación de alelos *lytA*_{PPH} más completa descrita hasta la fecha (Tabla 16). Mientras que sólo el 3.5% (2/56) de los aislados del serotipo 1 presentó profago, entre las cepas de serotipo 3 o no se encontraron profagos en ciertos ST o los que se encontraron dentro de un mismo ST tendían a presentar el mismo alelo *lytA*_{PPH}, lo que sugiere que los aislados de estos dos serotipos empezaron a adquirir profagos sólo recientemente (en términos evolutivos). Concretamente, el alelo *lytA*_{4_PPH} es más frecuente que el alelo *lytA*_{22_PPH} en el serotipo 3, lo que podría sugerir que este último es de más reciente adquisición entre las cepas de este serotipo. El serotipo 1 es altamente invasivo y muy poco común en individuos portadores, un estilo de infección que, previsiblemente, dificulta el intercambio de material genético (y la adquisición de fagos) con SMGs y otros neumococos que forman parte de la microbiota comensal.

En el caso de las cepas con serotipo 19A, se secuenciaron los genes *lytA*_{PPH} de 15 aislados, que correspondieron a 10 alelos distintos. Los aislados de este serotipo podrían poseer una mayor predisposición a la adquisición de fagos, quizás relacionada con la composición del CPS, ya que, en general, se considera que la cápsula de neumococo representa una barrera a la infección fágica (Bernheimer y Tiraby, 1976). Además, como ya se ha comentado más arriba, el serotipo 19A es genéticamente muy promiscuo, es decir, aislados con distintos genotipos (con sus fagos atemperados característicos) parecen adquirir y acomodar esta cápsula muy fácilmente. Es de destacar el hecho de que las cepas del ST202 habrían adquirido recientemente dichos fagos ya que todos los *lytA* secuenciados pertenecen al mismo alelo (*lytA*_{20_PPH}). Contrariamente, la variabilidad alélica de los aislados con ST63, ST433 y ST1201 es mayor, lo que indica que adquirieron los fagos en una fase previa. El estudio del contenido fágico, así como del momento en el que tuvo lugar la adquisición de estos profagos resulta de gran interés en neumococo y otras bacterias porque éstos, al igual que lo conocido en otras bacterias (Brüssow *et al.*, 2004; Buckling y Brockhurst, 2012; Lang *et al.*, 2012), porque éstos podrían estar contri-

buyendo a la diversificación de la arquitectura genómica de la bacteria, lo cual podría tener un papel importante en la virulencia del patógeno (Loeffler y Fischetti, 2006; Boyd, 2012; Boyd *et al.*, 2012).

Resulta importante recordar que aislados con el mismo ST pueden presentar muchas diferencias a nivel genético; por ejemplo, pueden presentar diferente serotipo como resultado de eventos recombinacionales en el locus capsular (Coffey *et al.*, 1998). En relación a este hecho, Romero y cols. (2009b) detectaron diferencias genéticas en cepas con el mismo serotipo y ST debido a variaciones en su contenido fágico. Corroborando lo descrito por estos autores, en esta Tesis se ha confirmado que, aunque los STs que se agrupan dentro del mismo nodo pueden compartir el mismo alelo *lytA*_{PPH} (ST202, ST320, ST3995), no lo hacen en otros casos (ST63 y ST1201; ST433 y ST717), e incluso existen cepas con el mismo serotipo y ST que no comparten el mismo alelo *lytA*_{PPH} (Fig. 13).

El disponer de una amplia colección de alelos *lytA*_{PPH} permitió ampliar la búsqueda de eventos de recombinación que hubieran podido tener lugar entre los alelos *lytA*_{Spn} y *lytA*_{PPH}. El alineamiento de los alelos *lytA*_{PPH} y *lytA*_{Spn} permitió descubrir una muy probable recombinación entre el alelo *lytA*_{26_PPH} y el alelo *lytA*_{25_Spn} dando lugar al alelo *lytA*_{22_PPH} (Fig. 16). Este dato confirma las observaciones obtenidas al principio de este trabajo y apoya firmemente la hipótesis de que los genes fágicos podrían desempeñar un papel importante en la evolución de los genes bacterianos implicados en virulencia.

Continuando con el estudio de la variabilidad alélica del gen *lytA*, una búsqueda en las BD reveló que, recientemente, se habían secuenciado una serie de cepas de SMG que poseían genes tipo *lytA* con características peculiares de tamaño y/o secuencia, en comparación con los descritos hasta ese momento (Tabla 18). Concretamente, pertenecían a las especies *S. infantis* (cepa SK970), *S. mitis* (cepas SK597 y SK1073) y *S. oralis* (cepas SK313 y ATCC 49296); estos genes correspondían a genes de tipo fágico, con la excepción de *lytA*_{SK597} y *lytA*_{SK564} que son de tipo bacteriano. Hasta el momento, el gen *lytA* únicamente se había descrito en *S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* y una serie de estreptococos no bien clasificados (Díaz *et al.*, 1992a; Obregón *et al.*, 2002; Arbique *et al.*, 2004; Llull *et al.*, 2006; Madhour *et al.*, 2011) por lo que ésta es la primera vez que se describe este gen en aislados de *S. infantis* y *S. oralis*. Al comparar las secuencias de aa de las nuevas NAM-amidasas LytA entre sí y respecto de las conocidas previamente, se observaron (salvo en la cepa *S. mitis* SK597 que sólo se diferencia en un aa del alelo

LytA_{22_SMG}) una serie de rasgos singulares tales como, unas secuencias de aa (sobre todo en el CBD) y tamaños extraordinariamente diferentes. Estos nuevos alelos presentaban rangos de valores PEDs de entre el 40% y el 50% y unos tamaños de 321 y 314 aa frente a 316 y 318 aa que presentan los alelos LytA conocidos previamente.

Todas las cepas analizadas (*S. infantis* SK970, *S. mitis* SK597 y SK1073, *S. oralis* SK313 y ATCC 49296) presentan colina en su pared como pudo concluirse de la lisis en presencia de Doc al 1% de cada una de las cepas cuando se “curaron” tales aislados con LytA_{R6} pura. En el caso de *S. infantis* SK970, se obtuvo otra evidencia de la presencia de colina en su pared: la inhibición de la autólisis del cultivo en la fase estacionaria y la formación de cadenas largas producidas como consecuencia de la adición de 2% de cloruro de colina al medio. El reconocimiento de la pared celular, entonces, podría ser similar al que ejercen los homólogos neumocócicos, a pesar de que los CBDs pudieran reconocer otras moléculas.

El estudio de la lisis en diferentes condiciones de las estirpes de SMG con LytAs peculiares reveló cierto comportamiento discrepante con respecto a lo descrito previamente (Tabla 20). Como ya se ha comentado, la LytA de *S. mitis* SK597 sólo se diferencia en un único aa (V168I) del alelo LytA_{22_SMG}. El alelo LytA_{22_SMG} está presente en las cepas de SMG, 1237 y 2859 (Balsalobre *et al.*, 2006) las cuales, al poseer un alelo LytA_{SMG} típico, no se lisan en presencia de Doc al 1% (pero sí al 0.1%). A pesar de la gran identidad compartida entre los alelos LytA_{SK597} y LytA_{22_SMG}, *S. mitis* SK597 no se lisa en presencia de Doc al 1% ni de Tritón-X100 al 1%. Además, las cepas de SMG con alelos LytA de tipo bacteriano se lisan al final de la fase estacionaria, mientras que LytA_{SK597} no lo hace a pesar de ser de tipo bacteriano. Por un lado, estos datos podrían estar indicando que *S. mitis* SK597 no se lisa en ninguna de las circunstancias ensayadas porque su LytA no tiene actividad enzimática suficiente. Ésta, sin embargo, no parece ser la razón del fenotipo porque los ensayos de actividad de LytA_{SK597} indicaron una actividad dentro del rango descrito para los alelos LytA_{SMG} (Fig. 24). Una expresión insuficiente del gen como para ocasionar una lisis indetectable del cultivo también fue descartada porque al añadir proteína purificada con este alelo a un cultivo de *S. mitis* SK597 tampoco se observó lisis apreciable (Tabla 21) y porque tampoco se ha detectado ninguna mutación en el promotor de dicho gen (Fig. 29B). Por último, SK597 es aparentemente una cepa híbrida entre *S. oralis* y *S. mitis* (Kilian *et al.* 2008), por lo que la estructura de su pared celular podría no ser el sustrato adecuado para esta enzima,

pudiendo, en un futuro, convertirse este gen *lytA* en un pseudogen con tendencia a desaparecer. *S. oralis* SK313 y *S. mitis* SK1073 poseen una *LytA* de tipo fágico lo que justificaría que ninguna de ellas se autolise ya que la expresión de las proteínas del profago se encontraría reprimida. Por otro lado, ambas cepas tampoco se lisaron en presencia de mitomicina C lo que podría sugerir que los genes *lytA* de ambas cepas estarían formando parte de profagos incompletos o defectivos y, por lo tanto, incapaces de entrar en el ciclo lítico. Sin embargo, el hecho de que las *LytAs* de ambos alelos no sean capaces de lisar un cultivo de la cepa de la cual provienen, puede indicar que, aunque se estuvieran expresando dichas proteínas, éstas podrían ser incapaces de hidrolizar su propia pared y, por lo tanto, de lisar a la bacteria (nótese, no obstante, que en los ensayos se añadió una cantidad limitada de proteína; Tabla 21). Además, tanto *LytA*_{SK313} como *LytA*_{SK1073} mostraron una actividad específica muy baja cuando se ensayaron sobre paredes de neumococo (2–6% con respecto a *LytA*_{R6}).

S. oralis ATCC 49296 contiene dos genes *lytA* de tipo fágico por lo que no era esperable que se lisara al final de la fase estacionaria por la razón antes señalada. Esta estirpe sí se lisa en presencia de mitomicina C, lo que indicaría que, al menos uno de los genes *lytA* estaría formando parte de un profago capaz de entrar en ciclo lítico y que la *LytA* expresada es funcional, aunque ninguna de las variantes fuera capaz de lisar la cepa en cultivo. Una posible explicación a este hecho podría ser que en ambos casos se requiriera mucha mayor cantidad de proteína cuando la enzima actúa desde fuera que cuando lo hace desde el interior de la bacteria. Además, la acción de la holina —que anularía la fuerza protón motriz de la membrana celular— podría participar en la lisis de la bacteria.

El alelo *LytA* que presenta la cepa *S. infantis* SK970 es de tipo fágico. Esta cepa sí se lisa al final de la fase estacionaria lo que sugiere que la represión del profago no estaría actuando correctamente, aunque no se puede descartar que exista en su genoma una autolisina inhibible por 2% de cloruro de colina y aún por identificar. Hay que señalar, no obstante, que se ha encontrado una lisozima tipo Cpl-1, la cual en neumococo resulta enormemente destructiva y, que podría ser la responsable de la autólisis de *S. infantis* SK970. Esta lisozima tipo Cpl-1 (EGV03221.1) se encuentra formando parte de un fago atemperado, mientras que Cpl-1 está codificada por un fago lítico (López *et al.*, 1981). El alelo *LytA*_{SK970} presenta la delección T290–G291, la mutación V317T, la delección de dos aa más y un número importante de mutaciones respecto de los alelos *LytA*_{PPH} y *LytA*_{SPH}. En consecuencia, si esta

enzima fuera la responsable de la autólisis de la bacteria, ello querría decir que las mutaciones que presenta no serían suficientes para que la NAM-amidasa se inhibiera *in vivo* por el Doc al 1%, lo que no parece demasiado probable a la vista de resultados previos (Obregón *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004a).

Los dominios de unión a ligando que consisten en unidades repetidas de aa, son comunes entre las proteínas implicadas en procesos de reconocimiento. Concretamente, se ha identificado una clase de proteínas de *C. difficile* (toxinas A y B), *Streptococcus mutans* (glucosiltransferasas y proteínas de unión a glucanos), *Streptococcus downei* (glucosiltransferasas), *Leuconostoc mesenteroides* (glucansacarasas) y, por supuesto, *S. pneumoniae* (CBPs), que se caracterizan por su habilidad para unirse a una gran variedad de ligandos, como azúcares y colina, y que contienen secuencias repetidas conservadas que están localizadas, en su mayoría, en la parte C-terminal de la molécula (Tabla 25). Estas secuencias repetidas también son conocidas como motivos de unión a la pared celular (CWD). Al comparar las secuencias de aa de todas las repeticiones, destacan 3 aa conservados, el dipéptido YF y una glicina situada 10 residuos antes del dipéptido YF (Wren, 1991) (Tabla 26). Todas estas repeticiones pertenecen a la misma familia Pfam, PF01473. Las enzimas tipo LytA de SMG estudiadas en esta Tesis, se unen a colina por el hecho de que su C-terminal por secuencia corresponde con un CBD, porque se pueden purificar por cromatografía de afinidad con resinas que contengan DEAE-celulosa y eluir con un tampón enriquecido en colina. Estas enzimas podrían no ser capaces de lisar a su cepa hospedadora por razones técnicas (que la proteína sea inestable), divergencia de sus CBD (PED de 40–50% respecto a los conocidos) o afinidad por otro tipo de ligandos como ocurre en el caso de la toxina A de *C. difficile*, que reconoce azúcares. La toxina A de *C. difficile* presenta un dominio de unión a azúcares que, aunque su estructura se modifica en presencia de colina, tiene una mayor afinidad por azúcares (particularmente Gal α 1,3-Gal β 1,4-GlcNac) (Ho *et al.*, 2005; Demarest *et al.*, 2005). Este dominio de unión a azúcares presenta una estructura tridimensional que tiene un notable parecido con la del CBD de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos (Ho *et al.*, 2005). El hecho de que sea necesario un 2% de cloruro de colina para inhibir la unión de LytA a la pared celular de neumococo (Briese y Hakenbeck, 1985) indicaría que la afinidad relativa de LytA por la colina es baja, similar a la observada para el dominio de unión de la toxina A (Demarest *et al.*, 2005). Además, la colina induce la dimerización del dominio de unión a la pared de LytA —lo cual es importante para el posicionamiento del dominio ami-

dasa en la capa de peptidoglicano— así como estabiliza la estructura del mismo (Fernández-Tornero *et al.*, 2002a). La toxina A en presencia de colina también dimeriza y se estabiliza, sugiriendo que las repeticiones de la toxina A comparten ciertas similitudes funcionales con las proteínas tipo LytA (Demarest *et al.*, 2005). En términos evolutivos, los géneros *Leuconostoc* y, en menor medida *Clostridium*, se encuentran relacionados filogenéticamente con *Streptococcus*, siendo todos organismos Gram-positivos con bajo contenido en G+C. Este hecho, junto con que todos los dominios de unión a pared celular pertenecen a la misma familia Pfam (*CW binding_1*, PF01473) y todas las semejanzas encontradas entre la toxina A de *C. difficile* y las proteínas tipo LytA, indica que los CWD han evolucionado a partir de un ancestro común. Este tipo de dominio ha acabado cubriendo amplia y casi exclusivamente el filo Firmicutes, al que pertenecen un 94% de las proteínas con estos dominios. Las diferencias en los residuos no conservados, así como en el número y disposición de las unidades repetidas, dan lugar a la especificidad de la proteína. Esto ocurre en el caso de las toxinas A y B y las proteínas de unión a azúcares (GBPs), las cuales se unen a diferentes redes de carbohidratos presentando repeticiones similares (Wren *et al.*, 1991). En otras clases de proteínas, como las celulasas y las quitinasas, se ha establecido que la disposición de los residuos aromáticos es el determinante más importante en la especificidad y afinidad a polisacáridos (Shah *et al.*, 2004). Por lo tanto, las diferencias que existen entre la variedad de repeticiones descritas en las diferentes especies (incluidas las descritas en esta Memoria en el CBD de los SMG) sugieren una diversificación y/o especialización a partir de una función general de reconocimiento y unión a ligandos, adaptada a diferentes moléculas (distintos tipos de azúcares, colina, etc.).

Tabla 25. Proteínas de unión a ligando de *Clostridium*, *Streptococcus* y fagos de estreptococos que presentan secuencias repetidas conservadas

Estirpe/Fago	Proteína	Tamaño (aa)	Tipo de repeticiones	Nº de repeticiones	Nº de aa por repetición	Referencia
<i>C. difficile</i>	Toxina A	2710	I y II	38	21-50	Dove <i>et al.</i> , 1990; Wren <i>et al.</i> , 1990
	Toxina B	2366	I y II	24	19-49	Barroso <i>et al.</i> , 1990
<i>S. downei</i>	GTF-I	1597	A	6	35	Ferreti <i>et al.</i> , 1987
	GTF-S	1365	A	4-6	32	Gilmore <i>et al.</i> , 1990
<i>S. mutans</i>	GTF-B	1475	A	4-6	32-33	Shiroza <i>et al.</i> , 1987
	GTF-C	1375	A	4-5	32-33	Ueda <i>et al.</i> , 1987
	GBP	563	A	5	32-34	Banas <i>et al.</i> , 1990
<i>S. pneumoniae</i>	LytA _{SPH}	318	CBR	7	20	García <i>et al.</i> , 1986; Llull <i>et al.</i> , 2006; Donati <i>et al.</i> , 2010; esta Tesis
SMG	LytA _{SMG}	316	CBR	7	20	Díaz <i>et al.</i> , 1992a; Whatmore <i>et al.</i> , 2000; Obregón <i>et al.</i> , 2003a; Balsalobre <i>et al.</i> , 2006; Llull <i>et al.</i> , 2006; Kilian <i>et al.</i> , 2008
Fagos de <i>S. pneumoniae</i>	LytA _{PPH}	318	CBR	7	20	Obregón <i>et al.</i> , 2003a; Loeffler y Fischetti, 2006; Frias <i>et al.</i> , 2009; Romero <i>et al.</i> , 2009a; esta Tesis
Fagos de SMG	LytA _{SPH}	314, 316, 318, 321	CBR	7	20	Díaz <i>et al.</i> , 1992b; Romero <i>et al.</i> , 2004a; Kilian <i>et al.</i> , 2008

GTF, glucosiltransferasa; GBP, proteína de unión a glicanos.

Tabla 26. Alineamiento de las secuencias consenso de las secuencias repetidas de aa presentes en *Clostridium*, *Streptococcus* y fagos de estreptococos que presentan proteínas de unión a ligando

Proteína	Tipo de repetición	Estirpe/fago	Secuencia consenso de las repeticiones (≥50% de identidad)
Toxina A	I	<i>C. difficile</i>	MQIGVFKGPNGFYFAPANTDANNIEGQAI
Toxina B	BI	<i>C. difficile</i>	MQIGVFNTEDGFKYFAPANTLDENxEGEAI
Toxina B	BIIE	<i>C. difficile</i>	xxxxGxxxIDDxxYFxxxGI
Toxina A	IIC	<i>C. difficile</i>	IASTGYTIINGKHFFENTDGI
Toxina A	IID	<i>C. difficile</i>	IAAxGxxYIxNxxYFxxDxx
Toxina A	IIA	<i>C. difficile</i>	VYQNKFLTLNGKKYFNGNS
Toxina A	IIB	<i>C. difficile</i>	KAVTGWQIDGKKYFNTINTA
GBP	A	<i>S. mutans</i>	WYYxGADGKxVTGWQIDGKxYFxxGxQVKG
GTF-B	A	<i>S. mutans</i>	WFYFDNNGYAVTGARTINGQHLVFRANGVQVKG
GTF-C	A	<i>S. mutans</i>	WxYFDNNGxMVTGxxxxHGxLYFxxNGIQAKG
GTF-I	A	<i>S. downei</i>	WYYxGKDGGKAVTGAQTIKxQXYFxxANGxQVKG
GTF-S	A	<i>S. downei</i>	WxYFNxDGxxxTGGxTIDGQTVYFDDNGxQVKG
LytA _{SPH}	CBR	<i>S. pneumoniae</i>	DNSGEMATGWKKIADKWWYF
LytA _{PPH}	CBR	fago de neumococo	DQSGEMATGWKKIAEKWYF
LytA _{SMG}	CBR	SMG	DQSGEMATGWKKIAEKWYF
LytA _{SPH} (316/318)	CBR	fago de SMG	DXSGExATGWKKIAEKWYF
LytA _{SPH} (Esta Tesis)	CBR	fago de SMG	DKRGAMVTGWMxxxHRWYx

LytA_{SPH} (316/318), alelos LytA_{SPH} con tamaños de 316 o 318 aa.

LytA_{SPH} (Esta Tesis), alelos LytA_{SK313}, SK970, SK1073, Sor_1, Sor_2.

Como ya se ha mencionado repetidamente a lo largo de esta Tesis, LytA es un factor de virulencia casi exclusivo de *S. pneumoniae*. El dominio *Amidase_2* (PF01510) está presente en 3179 aislados bacterianos (entre ellos, 953 Firmicutes, 1615 Proteobacterias, 358 Actinobacterias y 126 Bacteroidetes), 291 fagos y 154 eucariotas, mientras que el dominio *CW_binding_1* (PF01473) se ha encontrado en 530 aislados de bacterias (498 Firmicutes, 26 Actinobacterias y 6 Proteobacterias) y 16 fagos (todos de estreptococos y, esencialmente, los estudiados en esta Tesis) (último acceso a la BD, 1 de noviembre de 2013). Concretamente, el dominio *Amidase_2* es muy común en otros géneros de bacterias Gram-positivas. Se realizó una búsqueda mediante Pfam de los dominios amidasa y se estudió la arquitectura de dominios de las proteínas encontradas. En la gran mayoría de los casos, el dominio amidasa está fusionado a repeticiones de unión a glúcidos (SH3-5). Los dominios amidasa de estas proteínas mostraban un grado de identidad inferior al 40%, indicativo de una elevada divergencia, menos en el caso de *Gemella haemolysans* y *Weissella paramesenteroides*. Destaca el primer caso, ya que un 69% de identidad con LytA sugiere un fenómeno de transferencia horizontal reciente desde un estreptococo (neumococo o estreptococo *viridans*) seguida de una fusión por recombinación con el dominio SH3-5, probablemente porque esta especie no dispone de colina en la pared y ha tenido que adaptarse (Fig. 35). La adquisición del dominio amidasa de LytA por *G. haemolysans* podría haber sido determinante en la transformación de una especie comensal en un patógeno oportunista ya que se han publicado recientemente numerosos casos de enfermedad invasiva, en los que esta especie está implicada, como empiema (Aibar-Arregui *et al.*, 2012), bacteriemia (Malik *et al.*, 2010), endocarditis (Kovaleva *et al.*, 2012) y meningitis (Hayashi *et al.*, 2013). Sin embargo, no se encontraron proteínas similares en la mayoría del resto de estreptococos patógenos como *S. agalactiae* y *S. pyogenes*. Los datos sugieren una adquisición del gen *lytA* en un momento temprano del surgimiento del grupo Mitis seguido de un posterior refinamiento hasta las LytA actuales de *S. pneumoniae*, adaptadas exclusivamente a la patogenicidad de éste.

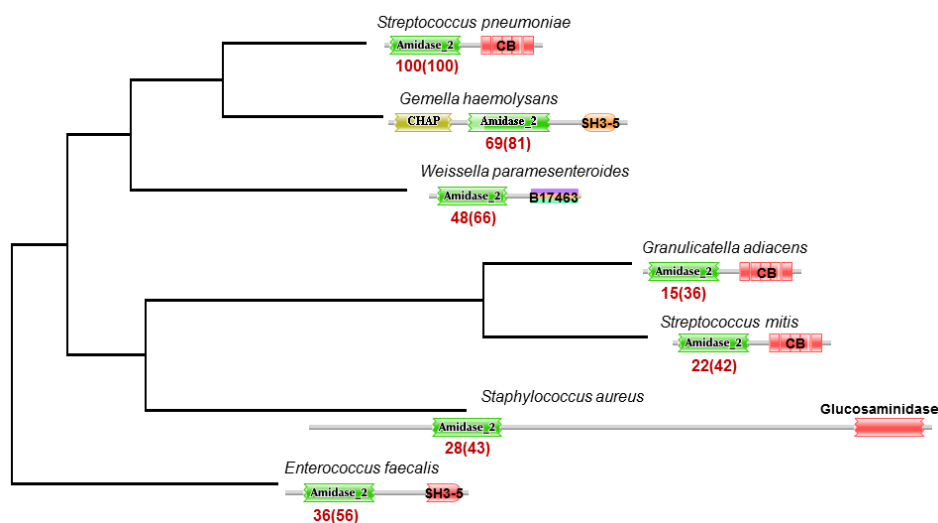


Fig. 35. El universo *Amidase_2* en bacterias Gram-positivas. Árbol filogenético basado exclusivamente en la secuencia del dominio *Amidase_2* de proteínas de especies representativas. El porcentaje de identidad (similitud) respecto a proteínas representativas se muestra en marrón.

El interés del estudio de los alelos *LytA* de estas cepas de SMG no sólo reside en averiguar algo más sobre la evolución de esta proteína —con las implicaciones taxonómicas que eso implica— sino también en la posibilidad de que la presencia de homólogos de esta proteína en estas especies les pueda conferir un mayor potencial de virulencia debido a que, como consecuencia de la acción de la NAM-amidasa *LytA*, se liberan fragmentos de pared celular con un alto potencial inflamatorio (Tuomanen, 2000; Moreillon y Majcherzyk, 2003) y otros factores de virulencia como la neumolisina (Marriott *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2013; Vernatter y Pirofski,

2013). Además, se ha demostrado que LytA ayuda a la célula a evadir el sistema inmune del hospedador (Ramos Sevillano *et al.*, 2013), lo cual también estaría contribuyendo a que estos estreptococos presentaran una mayor patogenicidad, sin la cual, probablemente, serían especies puramente comensales sin ninguna capacidad de producir infecciones (al menos en individuos inmunocompetentes). Por otro lado, hasta el momento, únicamente se ha conseguido cristalizar el CBD de esta proteína (C-LytA) (Fernández-Tornero *et al.*, 2001, 2002a, b). El dominio amidasa de estos nuevos alelos LytA, a pesar del elevado parecido con los alelos LytA_{Spn}, podrían ser lo bastante diferentes como para presentar una mayor tendencia a la cristalización, de tal manera que se pudiera obtener el cristal de una proteína LytA completa, lo que permitiría conocer en mayor profundidad su mecanismo de acción.

Como se ha expuesto en la Introducción, debido a la enorme semejanza fenotípica y genotípica entre las especies que forman el grupo Mitis, no siempre es posible una identificación clínica precisa del estreptococo α -hemolítico que está causando la infección, lo cual resulta de vital importancia a la hora de establecer la terapia adecuada. El estudio de la variabilidad alélica del gen *lytA* presentado en esta Tesis ha permitido diseñar una serie de cebadores que, mediante una PCR seguida de una detección electroquímica sumamente sensible, permiten detectar y discriminar entre neumococos y otros SMG que también poseen un gen tipo *lytA* (Campuzano *et al.*, 2011). Este procedimiento ha sido patentado en diversos países (García López *et al.*, 2009) y se está procediendo a su validación clínica en colaboración con los grupos de los Drs. J. Mingorance (Grupo de Microbiología Molecular, IdiPaz, Madrid) y J.M. Pingarrón (Dpto. de Química Analítica, UCM, Madrid), con resultados muy prometedores.

Durante la escritura de esta Tesis se realizó una nueva búsqueda en las BD de todas las secuencias del gen *lytA* disponibles (última fecha de acceso 2 de octubre de 2013). Sorprendentemente, el número de genomas de *S. pneumoniae* secuenciados (o en secuenciación avanzada) había aumentado de manera espectacular. Se analizaron todas las nuevas entradas, encontrándose un total de 44 alelos LytA_{Spn}, 27 alelos LytA_{SMG}, 100 alelos LytA_{PPH} y 14 alelos LytA_{SPH} (Anexo). Se confirmó que todos los alelos LytA_{Spn}, no descritos hasta este momento, pertenecían a la Fam_A o Fam_B. Se realizó un alineamiento de todos los alelos LytA (LytA_{Spn}, LytA_{SMG}, LytA_{PPH} y LytA_{SPH}) cuya secuencia completa estaba disponible (Fig. 36). Como ya se había observado, el clado de los alelos LytA_{Spn} sigue siendo el menos polimórfico (27 posiciones polimórficas), seguido, por este orden, por los clados

LytA_{SMG} (41 posiciones polimórficas), LytA_{PPH} (65 posiciones polimórficas) y LytA_{SPH} (155 posiciones polimórficas). Los alelos LytA_{SPH} constituyen, con diferencia, el grupo más polimórfico. Se pudieron distinguir, al menos, dos grupos de alelos LytA_{SPH} claramente diferentes, constituidos por los alelos: 1) LytA_{5, 6, 7, 9, 10, 11_SPH} y 2) LytA_{1, 2, 3, 4, 8, 12_SPH}.

DISCUSIÓN

```

1111111122222222233333
348056777780011233455500011
132066134522417103623645628

Alelo
2_SPN      FWTTKHGTIEDJSGARWWDNEAKPEDK
1_SPN      ::::::::::::::::::::R:::
4_SPN      ::::Y::::::::::
5_SPN      ::::Y::::::::::E:::::
6_SPN      ::::::::::::::::::::DE:
15_SPN     ::::::::::::::VD:::E::::
16_SPN     ::::::::::::::VD:::E::S::
18_SPN     ::::::::::::::EDV::::
20_SPN     ::::Y::::::::::EDV::::
27_SPN     S::::::::::EDV::::
29_SPN     S::::::::::T:::::
33_SPN     ::::::::::::::::::::D:::
35_SPN     ::S::::::::::
36_SPN     ::::YD::::::::::
38_SPN     ::C::::::::::
41_SPN     ::::Y::::::::::DV::::
42_SPN     ::::Y:::::G::::::::::D:::
43_SPN     ::ASQ:SAAG::GSKYQEDV::D::
44_SPN     ::::::::::::::EDV::::N

```

[illegible][illegible][illegible]

Fig. 36. Alineamiento de las secuencias de aa de los alelos *LytA_{Spm}*, *LytA_{SMG}*, *LytA_{PPH}* y *LytA_{SPH}* cuya secuencia completa está disponible en las BD. Sólo se muestran los aa de las posiciones en las que hay polimorfismo. Las posiciones de los aa han de leerse en vertical. El alelo *LytA_{14_SPH}* no se ha incluido por su elevado polimorfismo en la región N-terminal. El número que se le ha asignado a cada alelo *LytA* es el mismo que su alelo *lytA* correspondiente. Los dos puntos indican aa idénticos.

2. LOS DIFERENTES CLADOS DE LYTA PRESENTAN DIFERENTES RESIDUOS EN POSICIONES ESPECÍFICAS QUE COLOCALIZAN EN LA ESTRUCTURA

Se predijeron los SDPs de los clados LytA_{PPH} , LytA_{SPH} y LytA_{SMG} frente a LytA_{Spn} con la intención de averiguar la causa de las diferencias de actividad entre las diferentes subfamilias de alelos. Se encontró que únicamente 10 de los 54 SDPs, coincidían en, al menos, dos de los clados. De ellos, sólo dos SDPs (H32 y C60) fueron exclusivos del clado LytA_{Spn} . Estos aminoácidos están sustituidos por Asn y Arg, respectivamente en los otros 3 clados (Tabla 22). Esto podría indicar que estos dos residuos son los únicos específicos de los alelos LytA_{Spn} y que podrían considerarse los responsables en cuanto a las diferencias de actividad observadas entre los tres clados y el de neumococo. Al localizar los SDPs característicos de cada clado (PPH, SPH y SMG) sobre el modelo de la estructura de los dos dominios, se encontró una fuerte correlación posicional de cada clado tanto en el dominio amidasa como en el CBD. Aunque no se dispone de información pormenorizada de la función de cada CBR —excepto de la existencia de dos tipos de sitios de unión a colina que difieren en su afinidad por el aminoalcohol (Medrano *et al.*, 1996; Usobiaga *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2000) y de que las dos últimas CBRs se encuentran implicadas en la dimerización (Fernández-Tornero *et al.*, 2002)—, las diferencias mostradas por los tres clados sugieren distinto grado de afinidad por la colina e, incluso, especificidad por moléculas de la pared celular. Además, las sustituciones en el dominio amidasa podrían indicar diferencias en las propiedades catalíticas entre las subfamilias. Con el fin de aportar algún dato más al respecto, se intentó localizar el centro activo de la enzima buscando la cavidad más voluminosa sobre el modelo estructural generado en esta Tesis para el dominio amidasa encontrándose que, la cavidad más probable en la que pueda residir el centro activo de LytA se encontraba en la región apical de la proteína (Fig. 27). Además, se determinó el grado de conservación relativa. Los datos obtenidos sugieren fuertemente que dicha cavidad corresponde al centro activo de la enzima ya que los picos de conservación tendían a rodear la principal cavidad detectada. Los SDPs más cercanos a la misma son los correspondientes al clado LytA_{SMG} , indicando que los alelos LytA_{SMG} podrían presentar una afinidad por el sustrato (la pared celular) distinta al resto.

3. UTILIDAD DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES *LYTA* Y *GALU* EN ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y SU APLICACIÓN EN LA TIPIFICACIÓN DE *S. PNEUMONIAE*

Como ya se expuso en la Introducción de esta Tesis, las principales técnicas que actualmente se utilizan para la tipificación de neumococo presentan una serie de limitaciones. Por un lado, la técnica de PFGE —aunque posee una gran resolución y reproducibilidad— es laboriosa, consume mucho tiempo y la comparación de los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios no siempre es fácil. Por otro, la utilización exclusiva de la serotipificación, aunque muy útil en determinados casos, no es aconsejable ya que aislados de un mismo serotipo puede presentar una variabilidad genética sustancial. Finalmente, la técnica MLST —la más utilizada actualmente— es una técnica simple, reproducible y que permite una fácil comparación de resultados entre laboratorios. Sin embargo, el MLST es costoso económicamente para los laboratorios clínicos y, al igual que ocurre con aislados del mismo serotipo, aislados del mismo secuencitipo pueden mostrar mucha variabilidad genética (Silva *et al.*, 2006; Hiller *et al.*, 2010; Croucher *et al.*, 2011). En definitiva, la clasificación ideal de cepas clínicas exige un grado de granularidad tan fino que sólo es alcanzable mediante la secuenciación del genoma completo. Aunque en los últimos años se han reducido los costes económicos y temporales que requiere este tipo de tecnología, gracias a la pirosecuenciación y las herramientas automáticas de ensamblaje de secuencias y anotación de las mismas, la secuenciación rutinaria de genomas completos en el laboratorio clínico no parece factible a corto plazo. Por lo tanto, sería deseable un nuevo sistema de tipificación que combinara la sensibilidad y reproducibilidad del MLST con un menor número de genes con el fin de reducir los costes de la técnica y así poder ser implementada en la práctica diaria de los laboratorios clínicos. El nuevo sistema propuesto en esta Tesis consistió inicialmente en la secuenciación de un único gen, típico (aunque no exclusivo) de neumococo como es *lytA*, con la intención de reducir de manera importante el coste de la técnica así como de poder aumentar el poder de resolución de la misma. Se escogió este gen por nuestros conocimientos sobre su filogenia y peculiaridades, así como porque parecía cumplir las condiciones necesarias para formar parte de un buen sistema de tipificación molecular: las secuencias de los alelos *lytA* de neumococo presentan una serie de características distintivas respecto a alelos presentes en fagos o en otros SMG. Se consideró adecuada la secuenciación del gen completo ya que posee un tamaño tal (957 pb) que puede llevarse a cabo únicamente con un par de

cebadores. Este gen es moderadamente polimórfico, a diferencia de los analizados en el MLST, que por su elevado grado de conservación no son adecuados para diferenciar estirpes muy relacionadas pero diferentes. Se han descrito otros genes altamente polimórficos en neumococo que podrían ser también candidatos atractivos para un sistema alternativo (o complementario) de tipificación. Sin embargo, tales genes poseen una alta tendencia a sufrir inserciones/deleciones así como variaciones en su tamaño en unas cepas respecto de otras, como es el caso de los genes *pspA*, *pspC* y *lytB* (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Ianelli *et al.*, 2002; Moscoso *et al.*, 2005; Croucher *et al.*, 2011). Además, por su elevado tamaño precisan de más de un par de cebadores para su secuenciación completa e incluso algunos de ellos — por ejemplo, *psrP*— no se encuentran en todos los aislados de neumococo (Obert *et al.*, 2006; Croucher *et al.*, 2011) lo que no permitiría una tipificación completa de la especie.

Como primera aproximación y para saber si el planteamiento era el adecuado, se realizó un análisis *in silico*. Para ello, se seleccionó como referencia el filograma basado en genoma núcleo alineable de 44 cepas publicado por Donati *et al.* (2010), considerado el análisis más robusto sobre las relaciones filogenéticas entre aislados de neumococo. Este árbol se comparó con los construidos a partir de la concatenación génica de los distintos secuencitipos y de los alelos *lytA* de las mismas 44 cepas. Se observó que la estructura de nodos del árbol construido a partir de los secuencitipos, aparentemente, no se correspondía con la del filograma de Donati (Fig. 6). Ello es probablemente debido a que en el MLST se analizan siete genes muy conservados perdiendo, de esta manera, mucha información debido a que el genoma de neumococo se encuentra en constante evolución por medio de eventos de recombinación mediante transferencia horizontal. Sin embargo, el filograma con los alelos *lytA*, no mostró una mayor consistencia (Fig. 7A), seguramente debido a la gran variabilidad que aportan los fagos de neumococo con el gen tipo *lytA* que poseen y que recombina con el gen bacteriano. Para intentar mejorar estos resultados se consideró adicionalmente el gen *galU*, por tratarse de un gen altamente polimórfico y que podría complementar notablemente el grado de discriminación entre estirpes proporcionado por *lytA*. Al construir el árbol basado en el gen *galU* de las 44 cepas, las correspondientes a los ST62 y ST180 se agrupaban juntas, al igual que en el árbol de Donati y a diferencia del árbol con los MLSTs (Fig. 7B). Además, confirmando los resultados previamente descritos en el apartado 1 de Resultados, se observó que los alelos *lytA* se pueden clasificar en dos familias (A y B) y que ocurre

lo mismo en el caso de los alelos *galU* (familias I y II) (Fig. 8). Tomando ambas familias y dependiendo de la combinación de alelos *lytA* y *galU*, se clasificaron las cepas en cuatro grupos. Al construir un árbol con la concatenación de los genes *lytA* y *galU* de las 44 cepas se observó que las cepas de nodos de profundidad media tendían a coincidir en el grupo *lytA-galU*, incluyendo algunos con distintos serotipos y MLSTs, siendo el tipo de alelo *galU* el más determinante en la topología del árbol. Además, en el filograma basado en el genoma completo, cepas del mismo grupo también se localizaban juntas (Fig. 9). La coherencia encontrada entre el árbol deducido del genoma completo y el construido sobre la base de la concatenación de *lytA* y *galU*, llevó a seguir adelante con el intento de validar una secuenciación génica alternativa al MLST. Para ello, se secuenciaron los genes *lytA* y *galU* de 164 aislados clínicos. Las secuencias de estos aislados, junto con las disponibles en las BD, se utilizaron para construir filogramas basados en los alelos *lytA*, *galU* y en su concatenación. Los resultados obtenidos son equivalentes a los observados con las cepas de Donati y cols. (Fig. 10). A la vista de estos resultados se intuía que la secuenciación de únicamente estos dos genes podría ser utilizada como una técnica de tipificación molecular de *S. pneumoniae* con un coste menor que el MLST y pudiendo, además, mejorar la problemática de resolución limitada que plantea dicho método. Por lo tanto, se procedió al análisis estadístico de los datos obtenidos.

Para el análisis estadístico se emplearon dos tipos de aproximaciones, continua y discreta. En la aproximación continua se compararon las distancias filogenéticas de cada cepa con respecto al grado de identidad de sus alelos (*lytA*, *galU* o ST). Esta comparación mostró que las distancias entre los alelos *lytA*, *galU* y la concatenación de ambos, no se correspondían con las distancias genómicas. Sin embargo, la correspondencia entre el grado de identidad de los STs y las distancias genómicas era mucho mayor (Fig. 11). Por lo tanto, el uso de los alelos *lytA*, *galU* o su concatenado no es una estrategia de tipificación que representara las distancias reales entre las cepas mejor que la ya establecida mediante el MLST. En la aproximación discreta, se clasificaron las cepas según su alelo *lytA*, *galU* o combinación de ambos; se analizó si cada uno de ellos correspondía con sólo un grupo de neumococos considerando dos niveles: linaje y serotipo. A la vista de los resultados, se puede concluir que los concatenados de secuencias *lytA-galU* y MLST son exactos, para clasificar neumococos a nivel de linaje, y estadísticamente comparables, a nivel de serotipo. Por su grado preciso de polimorfismo, el sistema *lytA-galU* resulta ser un método eficaz, basado en clases independientes, para predecir serotipo secuen-

ciendo sólo dos genes, mientras que la pequeña ventaja del MLST conlleva un mayor gasto económico, temporal y de esfuerzo humano (secuenciación y análisis de 6 genes en lugar de dos), además de una mayor división del universo de las estirpes neumocócicas.

4. CONTEXTO GENÓMICO DEL GEN *LYtA* EN *S. PNEUMONIAE* Y OTROS SMG

Los genes *lytA* y *ply* forman parte de una isla que no está presente, por ejemplo, en el genoma de *S. mitis* B6 (Denapaité *et al.*, 2010). En algunas cepas de *S. mitis* se ha descrito la presencia de un homólogo de la neumolisina llamado mitilisina (Jefferies *et al.*, 2007). Ocasionalmente, también se ha descrito en aislados de SMG la presencia tanto de *ply* como de *lytA* (Kearns *et al.*, 2000; Whatmore *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2008; Denapaité *et al.*, 2010). Como ya se ha indicado anteriormente, el estudio de los genes que rodean al gen *lytA* y su posible transmisión conjunta entre bacterias de la misma o diferente especie, permitiría una mejor comprensión de la evolución de este gen y su implicación en la filogenia y taxonomía del género *Streptococcus*. Por esta razón, se decidió profundizar en el estudio del contexto genómico del gen *lytA*. Previamente, Denapaité y cols. (2010) describieron, en la cepa de *S. pneumoniae* R6, una zona repetida presente en el extremo 3' del gen *dinF* (primer gen situado en posición 5' de *lytA*) y también en posición 3' de *ply*, sugiriendo que dichas repeticiones podrían corresponder con el sitio de integración de la región *ply/lytA*. En nuestro estudio del contexto genómico de *lytA*, se amplió la búsqueda de esta secuencia repetida a todas las cepas de neumococo cuya secuencia completa estaba disponible; observándose que la secuencia repetida descrita por Denapaité *et al.* (2010) es en realidad ligeramente mayor, 104 pb en vez de 94 pb (Fig. 28B). El siguiente paso consistió en ampliar el estudio a aquellas especies relacionadas con neumococo observándose que únicamente aquellos estreptococos que poseen un gen *lytA* tipo bacteriano portan a la vez el gen *ply* y una segunda copia de la secuencia repetida en el extremo 3' de *ply*. Por consiguiente, los estreptococos que poseen únicamente genes *lytA* de tipo fágico, no presentan *ply* ni una segunda copia de la secuencia repetida. La notable conservación de las secuencias localizadas en posición 3' de *ply* y 5' de *lytA* entre los SMG que se ha observado en este trabajo, estaría entonces, corroborando la hipótesis de Denapaité *et al.* (2010). *Ply* es una proteína que pertenece a una amplia familia de citolisinas dependientes de colesterol (Jedrzejewski, 2001) que se

encuentran presentes en, al menos, siete géneros de bacterias Gram-positivas incluyendo *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Listeria* (Alouf *et al.*, 1984). Como se ha encontrado colina y/o proteínas similares a las CBPs, entre otros, en los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Tabla 2), parece razonable suponer que podría haberse producido una transferencia horizontal de la región *ply/lytA* desde géneros como *Bacillus* o *Clostridium* a los SMG. Por otro lado, parece más probable que se hubieran producido dos eventos de transferencia horizontal independientes, uno en *S. pneumoniae* y otro en el resto de SMG ya que todos los aislados de neumococo presentan un gen *lytA* de tipo bacteriano de 957 pb, mientras que el resto de SMG presenta un gen *lytA* de 951 pb. El hecho de que las regiones situadas entre ambas copias de la repetición, en los estreptococos con gen *lytA* de tipo bacteriano, sean dos o cuatro veces mayor en neumococo que en *S. mitis*, indica que *S. mitis* adquirió esta región más recientemente que neumococo, aunque tampoco se puede descartar lo contrario y que el resultado del menor tamaño de esta región en *S. mitis*, fuera debido a que se han producido delecciones. La idea de una reciente adquisición de la región *ply/lytA* por parte de *S. mitis* también vendría respaldada por el hecho de que todos los aislados de neumococo analizados presentan dicha región, mientras que no ocurre lo mismo en el caso de *S. mitis*. En cualquier caso, es también posible que la presencia generalizada en neumococo de dicha región pudiera deberse a la más precisa (o más estricta) definición de la especie *S. pneumoniae* frente a la de la especie *S. mitis*.

Al analizar la región *ply/lytA* de las cepas de *S. pneumoniae* cuyo genoma completo estaba disponible, se descubrió el caso peculiar de la cepa de neumococo A45. Esta cepa ha sufrido una profunda reorganización genómica, ya que gran parte de su genoma se encuentra invertido o transpuesto con respecto al resto de cepas neumocócicas con genoma completo conocido. Hay que destacar el hecho de que sus genes *ply* y *lytA* se encuentran parcialmente delecionados; además, la parte no delecionada del gen *ply* se encuentra unida en fase a *lytA* formando así un nuevo ORF que potencialmente codificaría una proteína híbrida. No obstante, es muy posible que el gen resultante (SPNA45_00270), caso de ser transcrito y traducido, carezca de ambas actividades (NAM-amidasa y citolisina dependiente de colesterol). Se ha investigado el origen de la cepa A45. En primer lugar, al consultar los datos microbiológicos disponibles de la cepa (<http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/bin/GOLDCards.cgi?goldstamp=Gi07386>), parecería que se trata de una cepa aislada de un paciente afectado de neumonía. Sin embargo, la búsqueda de

homólogos de la proteína híbrida completa con la herramienta TBLASTN, proporciona un único número de acceso (AJ240675) que corresponde a una proteína prácticamente idéntica (sólo presenta dos cambios de aa respecto de la correspondiente a A45). Esta proteína pertenece a un aislado equino de neumococo (Whatmore *et al.*, 1999). Todos los aislados equinos de *S. pneumoniae* conocidos son de serotipo 3, se encuentran muy relacionados filogenéticamente y poseen la misma fusión *lytA-ply* (y en el mismo sitio) que la comentada aquí. En este mismo trabajo, se observó que dichos aislados equinos carecían tanto de actividad hemolítica como de NAM-amidasa, lo que indicaría que la cepa A45 posiblemente también carezca de ambas actividades. Por otro lado, al revisar la BD MLST se encontró que existe una cepa, EQ0001, de serotipo 3 y aislada de la nasofaringe de un caballo en 2005 en Reino Unido, que presenta el ST6934 y cuyo nombre alternativo es A45. Todos estos datos indicarían que la cepa de neumococo A45 corresponde a un aislado equino y no humano, como podría deducirse del trabajo de Donati *et al.* (2010).

VI. CONCLUSIONES

1. De todos los clados del gen *lytA* estudiados, *lytA*_{SPH} es el más polimórfico seguido, en orden decreciente, por *lytA*_{PPH}, *lytA*_{SMG} y *lytA*_{Spn}. El polimorfismo alélico del gen *lytA* de *S. pneumoniae* se concentra alrededor de tres posiciones nucleotídicas concretas (453, 767 y 923; mayoritariamente en la primera de ellas) mientras que en el resto de los clados, el polimorfismo se distribuye a lo largo de todo el gen.
2. Los alelos del clado *lytA*_{Spn} pueden clasificarse en dos familias (Fam_A y Fam_B) atendiendo a la secuencia situada entre las posiciones 441 y 465 del gen. Los alelos de la Fam_A presentan una diana para la enzima Bam-HI; los de la Fam_B otra para HincII. Esto permite su identificación por un simple ensayo enzimático sin necesidad de secuenciación.
3. Existe un gran número de eventos de recombinación entre los clados *lytA*_{Spn} y *lytA*_{PPH} por lo que los genes fágicos desempeñan un papel importante en la evolución de este factor de virulencia.
4. El 98% de las cepas de *S. pneumoniae* con serotipo 19A porta algún profago, defectivo o no, en línea con la marcada variabilidad genética de las cepas de este serotipo y en claro contraste con el serotipo 1, mucho más estable genéticamente. Estas observaciones también se correlacionan con los distintos tipos de patogenicidad de estos serotipos.
5. Las cepas *S. infantis* SK970, *S. oralis* SK313 y *S. oralis* ATCC 49296 poseen genes *lytA* codificados por profagos, siendo ésta la primera vez que se describe la presencia de dicho gen en estas especies. Este hallazgo corrobora el hecho de que los SMG (y sus fagos atemperados) podrían tener un papel importante en la diseminación del gen *lytA* entre los estreptococos α -hemolíticos que comparten un mismo hábitat incrementando sus propiedades virulentas.
6. Los alelos *LytA* de las cepas *S. infantis* SK970, *S. mitis* SK1073, *S. oralis* SK313 y ATCC 49296 son extraordinariamente diferentes, tanto en secuencia como en tamaño, a los conocidos previamente, por lo que estas variantes proteicas serían adaptaciones a la pared celular de estas bacterias.

CONCLUSIONES

7. Los alelos *LytA_{Spn}* presentan dos posiciones exclusivas de clado (H32 y C60), lo que sugiere que dichas posiciones desempeñan un papel importante en las diferencias catalíticas de la principal autolisina de neumococo con respecto a la del resto de clados.
8. Las posiciones determinantes de especificidad de cada clado tienden a localizarse en regiones específicas de la estructura tridimensional de la proteína, tanto en el dominio amidasa como en el de unión a colina. Estos cambios justificarían diferencias de actividad enzimáticas, afinidad por la colina y/o dimerización entre proteínas presentes en distintos clados.
9. La secuenciación y concatenación de los genes *lytA* y *galU* resulta una técnica precisa para clasificar neumococos a nivel de linaje y serotipo, estadísticamente comparable al MLST, con el consecuente ahorro temporal, económico y de esfuerzo humano al tratarse únicamente de dos genes.
10. Todos los SGM que poseen el gen *lytA* de tipo bacteriano también contienen el gen *ply*, por lo que ambos factores de virulencia podrían interaccionar funcionalmente y ser necesaria su transferencia horizontal simultánea para incrementar la virulencia de estos aislados.
11. La distancia existente entre las copias de la repetición directa (104 pb) que flanquean a los genes *ply* y *lytA* varía según el microorganismo pero parece seguir siempre un patrón básico (≈ 5 kb). Este dato, junto con la presencia de secuencias de inserción en la región situada entre ambos genes, indica la existencia frecuente de procesos de recombinación genética (inserción/delección) que sin embargo y salvo en el caso peculiar de neumococos de origen equino, no acarrear la pérdida de los genes *lytA* o *ply*.
12. En los SMG, existe una elevada conservación nucleotídica de las secuencias localizadas en las posiciones 3' de *ply* y 5' de *lytA*, lo que refuerza la hipótesis de que la secuencia de 104 pb corresponde al sitio de integración de la isla genómica *ply-lytA* y que sufre una duplicación como consecuencia de dicha integración.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aanensen, D.M. y Spratt, B.G. (2005) The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**: W728–W733.
- Abedon, S.T. (2009) Phage evolution and ecology. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**: 1–45.
- Abedon, S.T. y LeJeune, J.T. (2005) Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors. *Evol. Bioinform.* **1**: 97–110.
- Aibar-Arregui, M.A., de Escalante-Yanguela, B., Garrido-Buenache, A., Navarro-Aguilar, M.E., Montoya-Arenas, J. y Roldán-Roldán M.M. (2012) Empiomas pleurales por *Gemella* spp: una etiología no tan infrecuente. *Rev. Méd. Chile* **140**: 1544–1547.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- American Academy of Pediatrics – Committee on Infectious Diseases (2000) Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine (Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* **106**: 362–366.
- Andrewes, F.W. y Horder, T.J. (1906) A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* **168**: 708–713.
- Arbique, J.C., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Quesne, G., Carvalho, M.d.G.S., Steigerwalt, A.G., et al. (2004) Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4686–4696.
- Ardanuy, C., Marimón, J.M., Calatayud, L., Giménez, M., Alonso, M., Gran, I., et al. (2012) Epidemiology of invasive pneumococcal disease in older people in Spain (2007–2008): implications for future vaccination strategies. *PLoS One* **8**: e43619.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. y Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195–201.
- Arrecubieta, C., López, R. y García, E. (1994) Molecular characterization of *cap3A*, a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 3: sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *J. Bacteriol.* **176**: 6375–6383.
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008a) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect. Immun.* **76**: 5350–5356.
- Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008b) *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect. Immun.* **76**: 466–476.
- Austrian, R. (1986) Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* **18** (Suppl. A): 35–45.
- Avery, O.T. y Cullen, G.E. (1923) Studies on the enzymes of pneumococcus. IV. Bacteriolytic enzyme. *J. Exp. Med.* **38**: 199–206.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**: 137–158.
- Balsalobre, L., Hernández-Madrid, A., Llull, D., Martín-Galiano, A.J., García, E., Fenoll, A. y de la Campa, A.G. (2006) Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4163–4171.
- Balsalobre, L., Ortegaand, M. y de la Campa, A.G. (2013) Characterization of recombinant fluoroquinolone-resistant pneumococcus-like isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 254–260.
- Banas, J.A., Russell, R.R.B., and Ferretti, J.J. (1990) Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect. Immun.* **58**: 667–673.
- Barnard, J.P. y Stinson, M.W. (1996) The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect. Immun.* **64**: 3853–3857.

BIBLIOGRAFÍA

- Barroso, L.A., Wang, S.Z., Phelps, C.J., Johnson, J.L., Wilkins, T.D. (1990) Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4004.
- Beall, B.W., Gertz, R.E., Hulkower, R.L., Whitney, C.G., Moore, M.R. y Brueggemann, A.B. (2011) Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J. Infect. Dis.* **203**: 1360–1368.
- Benson, C.E. y Sweeney, C.R. (1984) Isolation of *Streptococcus pneumoniae* type 3 from equine species. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 1028–1030.
- Bentley, S.D., Aanensen, D., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M., *et al.* (2006) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* **2**: e31.
- Berg, K.H., Bjørnstad, T.J., Johnsborg, O. y Håvarstein, L.S. (2012) Properties and biological role of streptococcal fratricins. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 3515–3522.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. y Hammerschmidt, S. (2001) α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* **40**: 1273–1287.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. y Hammerschmidt, S. (2004) Characterization of plasmin(ogen) binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J. Med. Res.* **119** (Suppl.): 29–32.
- Bergström, N., Jansson, P.E., Kilian, M. y Sørensen, U.B.S. (2000) Structures of two cell wall-associated polysaccharides of a *Streptococcus mitis* biovar 1 strain. A unique teichoic acid-like polysaccharide and the group O antigen which is a C-polysaccharide in common with pneumococci. *Eur. J. Biochem.* **267**: 7147–7157.
- Bernheimer, H.P. (1977) Lysogeny in pneumococci freshly isolated from man. *Science* **195**: 66–68.
- Bernheimer, H.P. y Tiraby, J.-G. (1976) Inhibition of phage infection by pneumococcus capsule. *Virology* **73**: 308–309.
- Berry, A.M. y Paton, J.C. (2000) Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* **68**: 133–140.
- Bishop, C.J., Aanensen, D.M., Jordan, G.E., Kilian, M., Hanage, W.P. y Spratt, B.G. (2009) Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol.* **7**: 3.
- Blaschke, A.J. (2011) Interpreting assays for the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **52**: S331–S337.
- Boyd, E.F. (2012) Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage-pathogenicity island interactions. *Adv. Virus Res.* **82**: 91–118.
- Boyd, E.F., Carpenter, M.R. y Chowdhury, N. (2012) Mobile effectors proteins on phage genomes. *Bacteriophage* **2**: 139–148.
- Bonofiglio, L., García, E. y Mollerach, M. (2005) Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis. *Curr. Microbiol.* **51**: 217–221.
- Bonofiglio, L., García, E. y Mollerach, M. (2012) The *galU* gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **332**: 47–53.
- Bridge, P.D. y Sneath, P.H.A. (1982) *Streptococcus gallinarum* sp. nov. and *Streptococcus oralis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 410–415.
- Briese, T. y Hakenbeck, R. (1985) Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *Eur. J. Biochem.* **146**: 417–427.
- Briles, E.B. y Tomasz, A. (1970) Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a gram-positive bacterium. Segregation of choline-³H-labeled teichoic acid. *J. Cell Biol.* **47**: 786–790.
- Briles, E.B. y Tomasz, A. (1973) Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing LTA. *J. Biol. Chem.* **248**: 6394–6397.
- Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks-Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., *et al.* (1997) PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.* **3**: 401–408.

- Briles, D.E., Tart, R.C., Swiatlo, E., Dillard, J.P., Smith, P., Benton, K.A., *et al.* (1998) Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 645–657.
- Brooks-Walter, A., Briles, D.E. y Hollingshead, S.K. (1999) The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* **67**: 6533–6542.
- Brouwer, M.C., de Gans, J., Heckenberg, S.G.B., Zwinderman, A.H., van der Poll, T. y van de Beek, D. (2009) Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **9**: 31–44.
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W. y Beall, B. (2007) Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* **3**: e168.
- Brundish, D.E. y Baddiley, J. (1968) Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem. J.* **110**: 573–582.
- Brüssow, H., Canchaya, C. y Hardt, W.-D. (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 560–602.
- Buckling, A. y Brockhurst, M. (2012) Bacteria-virus coevolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* **751**: 347–370.
- Brzin, B. (1969) Reversion of α - into β -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia* **25**: 985–986.
- Calix, J.J., Porambo, R.J., Brady, A.M., Larson, T.R., Yother, J., Abeygunwardana, C. y Nahm, M.H. (2012) Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J. Biol. Chem.* **287**: 27885–27894.
- Camelo-Castillo, A., Benítez-Páez, A., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R. y Mira, A. (2013) *Streptococcus dentisani* sp. nov. a new member of the Mitis group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijs.1090.054098-054090.
- Camilli, R., Del Grosso, M., Iannelli, F. y Pantosti, A. (2008) New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 619–625.
- Campbell, A. (1988) Phage evolution and speciation. En *The Bacteriophages*, vol. 1. Calendar, R. (ed). New York: Plenum Publishing Corp., pp. 1–14.
- Campuzano, S., Pedrero, M., García, J.L., García, E., García, P. y Pingarrón, J.M. (2011) Development of amperometric magnetogenosensors coupled to asymmetric PCR for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**: 2413–2420.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) recommended immunization schedules for persons aged 0 through 18 years and adults aged 19 years and older — United States, 2013. *MMWR Surveill. Summ.* **62** (Suppl. 1): 1–19.
- Chester, F.D. (1901) *A manual of determinative bacteriology*. The MacMillan Co., New York.
- Chi, F., Nolte, O., Bergmann, C., Ip, M. y Hakenbeck, R. (2007) Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**: 503–512.
- Choi, S.C., Rasmussen, M.D., Hubisz, M.J., Gronau, I., Stanhope, M.J. y Siepel, A. (2012) Replacing and additive horizontal gene transfer in *Streptococcus*. *Mol. Biol. Evol.* **29**: 3309–3320.
- Ciruela, P., Martínez, A., Izquierdo, C., Hernández, S., Broner, S., Muñoz-Almagro, C., *et al.* (2013) Epidemiology of vaccine-preventable invasive diseases in Catalonia in the era of conjugate vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**: 681–691.
- Clarridge, J.E., III (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 840–862.
- Coffey, T.J., Enright, M.C., Daniels, M., Morona, J.K., Morona, R., Hryniewicz, W., *et al.* (1998) Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **27**: 73–83.

BIBLIOGRAFÍA

- Cole, R. (1914) The production of methemoglobin by pneumococci. *J. Exp. Med.* **20**: 363–378.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881–10890.
- Croucher, N.J., Walker, D., Romero, P., Lennard, N., Paterson, G.K., Bason, N.C., *et al.* (2009) Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae*^{Spain23F} ST81. *J. Bacteriol.* **191**: 1480–1489.
- Croucher, N.J., Harris, S.R., Fraser, C., Quail, M.A., Burton, J., van der Linden, M., *et al.* (2011) Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* **331**: 430–434.
- Damjanovic, M., Kharat, A.S., Eberhardt, A., Tomasz, A. y Vollmer, W. (2007) The essential *tacF* gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **189**: 7105–7111.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K. y McDaniel, L.S. (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect. Immun.* **69**: 3435–3437.
- de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A. y Muñoz, R. (1997) Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb. Drug Resist.* **3**: 177–193.
- de las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2001) Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb. Drug Resist.* **7**: 213–222.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2002) Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**: 4988–5000.
- del Cerro, C., Felpeto-Santero, C., Rojas, A., Tortajada, M., Ramón, D. y García, J.L. (2013) Genome sequence of the butanol hyperproducer *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Genome Announc.* **1**: e0007013.
- Demarest, S.J., Salbato, J., Elia, M., Zhong, J., Morrow, T., Holland, T., *et al.* (2005) Structural characterization of the cell wall binding domains of *Clostridium difficile* toxins A and B; evidence that Ca^{2+} plays a role in toxin A cell surface association. *J. Mol. Biol.* **346**: 1197–1206.
- Denapate, D. y Hakenbeck, R. (2011) A new variant of the capsule 3 cluster occurs in *Streptococcus pneumoniae* from deceased wild chimpanzees. *PLoS One* **6**: e25119.
- Denapate, D., Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Henrich, B., Maurer, P., *et al.* (2010) The genome of *Streptococcus mitis* B6 - What is a commensal? *PLoS One* **5**: e9426.
- Devereux, J., Haeberli, P. y Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387–395.
- Díaz, E., García, E., Ascaso, C., Méndez, E., López, R. y García, J.L. (1989) Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1238–1244.
- Díaz, E., López, R. y García, J.L. (1992a) Role of the major pneumococcal autolysin in the atypical response of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**: 5508–5515.
- Díaz, E., López, R. y García, J.L. (1992b) EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a *Myoviridae* morphotype. *J. Bacteriol.* **174**: 5516–5525.
- Díaz, E., Munthali, M., Lunsdorf, H., Hölte, J.-V. y Timmis, K.N. (1996) The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**: 667–681.
- Ding, F., Tang, P., Hsu, M.-H., Cui, P., Hu, S., Yu, J. y Chiu, C.-H. (2009) Genome evolution driven by host adaptations results in a more virulent and antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *BMC Genomics* **10**: 158.
- Do, T., Jolley, K.A., Maiden, M.C.J., Gilbert, S.C., Clark, D., Wade, W.G. y Beighton, D. (2009) Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology* **155**: 2593–2602.
- Dochez, A.R. y Avery, O.T. (1915) The occurrence of carriers of disease-producing types of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **22**: 105–113.

- Doern, C.D. y Burnham, C.-A.D. (2010) It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3829–3835.
- Domenech, M., García, E. y Moscoso, M. (2012) Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.* **5**: 455–465.
- Domenech, M., Ramos-Sevillano, E., García, E., Moscoso, M. y Yuste, J. (2013) Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **81**: 2606–2615.
- Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N., Angiuoli, S., *et al.* (2010) Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome Biol.* **11**: R107.
- Donkor, E. S., Stabler, R. A., Hinds, J., Adegbola, R.A., Antonio, M. y Wren, B.W. (2012) Comparative phylogenomics of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive disease and nasopharyngeal carriage from West Africans. *BMC Genomics* **13**: 569.
- Dopazo, J., Mendoza, A., Herrero, J., Caldara, F., Humbert, Y., Friedli, L., *et al.* (2001) Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb. Drug Resist.* **7**: 99–125.
- Dove, C.H., Wang, S.Z., Price, S.B., Pheolps, C.J., Lyster, D.M., Wilkins, T.D., *et al.* (1990) Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect Immun.* **58**: 480–488.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Liñares, J., *et al.* (1989) Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8842–8846.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Woodford, N., Johnson, A.P., George, R.C. y Spratt, B.G. (1990) Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5858–5862.
- Dubois, D., Segonds, C., Prere, M.-F., Marty, N. y Oswald, E. (2013) Identification of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates among other alpha and nonhemolytic streptococci by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1861–1867.
- Duthy, T.G., Ormsby, R.J., Giannakis, E., Ogunniyi, A.D., Stroehrer, U.H., Paton, J.C. y Gordon, D.L. (2002) The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. *Infect. Immun.* **70**: 5604–5611.
- Eberhardt, A., Hoyland, C.N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R.M., Johnsborg, O., *et al.* (2012) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **18**: 240–255.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H.S. y Håvarstein, L.S. (2009) Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* **155**: 2223–2234.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H.S., Berg, K.H., Hermoso, J.A. y Håvarstein, L.S. (2010) Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol. Microbiol.* **76**: 905–917.
- Enright, M.C. y Spratt, B.G. (1998) A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**: 3049–3060.
- Enright, M.C. y Spratt, B.G. (1999a) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**: 482–487.
- Enright, M.C. y Spratt, B.G. (1999b) Extensive variation in the *ddl* gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* results from a hitchhiking effect driven by the penicillin-binding protein 2b gene. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1687–1695.
- Euzéby, J.P. (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 590–592.
- Facklam, R.R. (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 613–630.

- Feil, E.J. (2004) Small change: keeping pace with microevolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 483–495.
- Feil, E.J., Maynard Smith, J., Enright, M.C. y Spratt, B.G. (2000) Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* **154**: 1439–1450.
- Feng, J., Lupien, A., Gingras, H., Wasserscheid, J., Dewar, K., Légaré, D. y Ouellette, M. (2009) Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res.* **19**: 1214–1223.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E. y de la Campa, A.G. (1994) Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol. Microbiol.* **12**: 587–598.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D. y Casal, J. (1997) Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 764–766.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1020–1024.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2002a) Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* **321**: 163–173.
- Fernández-Tornero, C., Ramón, A., Fernández-Cabrera, C., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2002b) Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the complete choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin. *Acta Crystallogr. Section D, Biol. Crystallogr.* **58**: 556–558.
- Ferrándiz, M.J., Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M. y de la Campa, A.G. (2005) Clinical Isolates of the Spain¹⁴-5 clone of *Streptococcus pneumoniae* carry a recombinant *rpoB* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4811–4813.
- Ferretti, J.J., Gilpin, M.L., and Russell, R.R. (1987) Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28. *J. Bacteriol.* **169**: 4271–4278.
- Fischetti, V.A. (2010) Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 357–362.
- Frey, P.A. (1996) The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**: 461–470.
- Frias, M.J., Melo-Cristino, J. y Ramirez, M. (2009) The autolysin LytA contributes to efficient bacteriophage progeny release in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **191**: 5428–5440.
- Frias, M.J., Melo-Cristino, J., y Ramirez, M. (2013) Export of the pneumococcal phage SV1 lysin requires choline-containing teichoic acids and is holin-independent. *Mol. Microbiol.* **87**: 430–445.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2010) New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol.* **10**: 190.
- García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P. y López, R. (1985) Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 225–230.
- García, P., García, J.L., García, E. y López, R. (1986) Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **43**: 265–272.
- García, J.L., García, E. y López, R. (1987a) Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149**: 52–56.
- García, J.L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C. y López, R. (1987b) Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J. Virol.* **61**: 2573–2580.
- García, E., García, J.L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1988) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 914–918.
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J. y López, R. (1998) Versatility of choline-binding domain. *Microb. Drug Resist.* **4**: 25–36.

- García, E., García, P. y López, R. (1993) Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 188–195.
- García, J.L., Díaz, E., Romero, A. y García, P. (1994) Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **176**: 4066–4072.
- García, P., González, M.P., García, E., García, J.L. y López, R. (1999a) The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**: 128–138.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R. y García, J.L. (1999b) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1275–1277.
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J. y López, R. (2000) Versatility of choline-binding domain. En *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. Tomasz, A. (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, pp. 231–244.
- García-Bustos, J.F. y Tomasz, A. (1987) Teichoic acid-containing muropeptides from *Streptococcus pneumoniae* as substrates for the pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **169**: 447–453.
- García López, E., García González, P., García López, J.L., Campuzano Ruiz, S., Morales Areizaga, M., Ardanuy Tisaire, C. et al. (2009) Detection of *Streptococcus pneumoniae* through magneto-amperometric genosensors employing specific primers and probes for the *lytA* gene. International patent 10837089.1-PCT/ES2010070836 y WO2011073488.
- Gasc, A.M., Kauc, L., Barraillé, P., Sicard, M. y Goodgal, S. (1991) Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **173**: 7361–7367.
- Gillespie, S.H., McWhinney, P.H.M., Patel, S., Raynes, J.G., McAdam, K.P.W.J., Whiley, R.A. y Hardie, J.M. (1993) Species of alpha-hemolytic streptococci possessing a C-polysaccharide phosphorylcholine-containing antigen. *Infect. Immun.* **61**: 3076–3077.
- Gilmore, K.S., Russell, R.R., and Ferretti, J.J. (1990) Analysis of the *Streptococcus downei* *gtfS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infect. Immun.* **58**: 2452–2458.
- Gisch, N., Kohler, T., Ulmer, A.J., Müthing, J., Pribyl, T., Fischer, K., et al. (2013) Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J. Biol. Chem.* **288**: 15654–15667.
- Glazunova, O.O., Raoult, D. y Roux, V. (2006) *Streptococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a patient blood culture. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1127–1131.
- Glazunova, O.O., Raoult, D. y Roux, V. (2010) Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2140–2148.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. y Masure, H.R. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 5690–5695.
- Gmür, R., Thurnheer, T. y Guggenheim, B. (1999) Dominant cross-reactive antibodies generated during the response to a variety of oral bacterial species detect phosphorylcholine. *J. Dent. Res.* **78**: 77–85.
- Gram, C. (1884) Ueber die isolirte färbung der schizomycetes in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschr. Med.* **2**: 185–189.
- Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113–159.
- Haanperä, M., Jalava, J., Huovinen, P., Meurman, O. y Rantakokko-Jalava, K. (2007) Identification of alpha-hemolytic streptococci by pyrosequencing the 16S rRNA gene and by use of VITEK 2. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 762–770.
- Haas, W., Hesje, C.K., Sanfilippo, C.M. y Morris, T.W. (2011) High proportion of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* isolates among sporadic, nonoutbreak cases of bacterial conjunctivitis. *Curr. Eye Res.* **36**: 1078–1085.
- Hakenbeck, R., Balmelle, N., Weber, B., Gardès, C., Keck, W. y de Saizieu, A. (2001) Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**: 2477–2486.

BIBLIOGRAFÍA

- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D. y Brückner, R. (2009) Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 572–586.
- Hall, L.M.C., Whiley, R.A., Duke, B., George, R.C. y Efstratiou, A. (1996) Genetic relatedness within and between serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from the United Kingdom: analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance patterns. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 853–859.
- Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P. y Chhatwal, G.S. (1997) SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25**: 1113–1124.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H. y Chhatwal, G.S. (1999) Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 1683–1687.
- Hanage, W.P., Kaijalainen, T., Herva, E., Saukkoriipi, A., Syrjänen, R. y Spratt, B.G. (2005) Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. *J. Bacteriol.* **187**: 6223–6230.
- Hanage, W.P., Fraser, C. y Spratt, B.G. (2006a) Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**: 1917–1927.
- Hanage, W.P., Fraser, C. y Spratt, B.G. (2006b) The impact of homologous recombination on the generation of diversity in bacteria. *J. Theor. Biol.* **239**: 210–219.
- Hanage, W.P., Fraser, C., Tang, J., Connor, T.R. y Corander, J. (2009) Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science* **324**: 1454–1457.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Handley, P., Coykendall, A., Beighton, D., Hardie, J.M. y Whiley, R.A. (1991) *Streptococcus crista* sp. nov., a viridans streptococcus with tufted fibrils, isolated from the human oral cavity and throat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 543–547.
- Hansman, D. y Bullen, M.M. (1967) A resistant pneumococcus. *Lancet* **290**: 264–265.
- Harrison, O.B., Brueggemann, A.B., Caugant, D.A., van der Ende, A., Frosch, M., Gray, S., *et al.* (2011) Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiology* **157**: 2181–2195.
- Håvarstein, L.S. (2010) Increasing competence in the genus *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.* **78**: 541–544.
- Håvarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. y Claverys, J.P. (2006) New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* **59**: 1297–1307.
- Hayashi, T., Uchiumi, H., Yanagisawa, K., Ogawa, Y., Handa, H., Tsukamoto, N. y Nokima, Y. (2013) Recurrent *Gemella haemolysans* meningitis in a patient with osteomyelitis of the clivus. *Intern. Med.* **52**: 2145–2147.
- Heidelberger, M. (1983) Precipitating cross-reactions among pneumococcal types. *Infect. Immun.* **41**: 1234–1244.
- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2759–2762.
- Henriques, B., Kalin, M., Örtqvist, Å., Olsson Liljequist, B., Almela, M., Marrie, T.J., *et al.* (2000) Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J. Infect. Dis.* **182**: 833–839.
- Hermoso, J.A., García, J.L. y García, P. (2007) Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 461–472.
- Hiller, N.L., Janto, B., Hogg, J.S., Boissy, R., Yu, S., Powell, E., *et al.* (2007) Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome. *J. Bacteriol.* **189**: 8186–8195.

- Hiller, N.L., Ahmed, A., Powell, E., Martin, D.P., Eutsey, R., Earl, J., *et al.* (2010) Generation of genic diversity among *Streptococcus pneumoniae* strains via horizontal gene transfer during a chronic polyclonal pediatric infection. *PLoS Pathog.* **6**: e1001108.
- Hirst, R., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C., Nicotera, P., Andrew, P. y O'Callaghan, C. (2008) *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.* **197**: 744–751.
- Ho, J.G.S., Greco, A., Rupnik, M. y Ng, K.K.-S. (2005) Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 18373–18378.
- Ho, S.S., Michalek, S.M. y Nahm, M.H. (2008) Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* **76**: 206–213.
- Hollingshead, S.K., Becker, R. y Briles, D.E. (2000) Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 5889–5900.
- Höltje, J.-V. y Tomasz, A. (1974) Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **249**: 7032–7034.
- Höltje, J.-V. y Tomasz, A. (1975a) Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1690–1694.
- Höltje, J.-V. y Tomasz, A. (1975b) Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by *N*-acetylmuramic acid Γ -alanine amidase of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **250**: 6072–6076.
- Höltje, J.V. y Tomasz, A. (1976) Purification of the pneumococcal *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**: 4199–4207.
- Horne, D.S. y Tomasz, A. (1993) Possible role of a choline-containing teichoic acid in the maintenance of normal cell shape and physiology in *Streptococcus oralis*. *J. Bacteriol.* **175**: 1717–1722.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., *et al.* (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**: 5709–5717.
- Hostetter, M.K., Cheng, Q. y Finkel, D.A. (1997) C3-binding protein (PbcA) in *Streptococcus pneumoniae*: accession number AF067128, abstr. B-478. En: Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology 1997. ASM Press.
- Howard, L.V. y Gooder, H. (1974) Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **117**: 796–804.
- Huch, M., De Bruyne, K., Cleenwerck, I., Bub, A., Cho, G.-S., Watzl, B., *et al.* (2013) *Streptococcus rubneri* sp. nov., isolated from the human throat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 4026–4032.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K. y Brown, J.S. (2010) The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect. Immun.* **78**: 704–715.
- Iannelli, F., Oggioni, M.R. y Pozzi, G. (2002) Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **284**: 63–71.
- Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G. y Björck, L. (2000) Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J. Biol. Chem.* **275**: 37257–37263.
- Jeong, C.-S. y Kim, D. (2012) Reliable and robust detection of coevolving protein residues. *Protein Eng. Des. Sel.* **25**: 705–713.
- Kalinina, O.V., Novichkov, P.S., Mironov, A.A., Gelfand, M.S. y Rakhmaninova, A.B. (2004) SDPpred: a tool for prediction of amino acid residues that determine differences in functional specificity of homologous proteins. *Nucleic Acids Res.* **32**: W424–W428.
- Kamerling, J.P. (2000) Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. En *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. Tomasz, A. (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc, pp. 81–114.
- Kämpfer, P. (2012) Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**: 3–11.

BIBLIOGRAFÍA

- Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Miura, H. y Ezaki, T. (1995) Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 406–408.
- Kawamura, Y., Hou, X.-G., Todome, Y., Sultana, F., Hirose, K., Shu, S.-E., *et al.* (1998) *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 921–927.
- Kawamura, Y., Whiley, R.A., Shu, S.-E., Ezaki, T. y Hardie, J.M. (1999) Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology* **145**: 2605–2613.
- Kilian, M., Mikkelsen, L. y Henrichsen, J. (1989) Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 471–484.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L.S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. y Sørensen, U.B.S. (2008) Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One* **3**: e2683.
- Kilpper-Bälz, R., Wenzig, P. y Schleifer, K.H. (1985) Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 482–488.
- King, S.J., Whatmore, A.M. y Dowson, C.G. (2005) NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J. Bacteriol.* **187**: 5376–5386.
- Kislak, J.W., Razavi, M.B., Daly, A.K. y Finland, M. (1965) Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am. J. Med. Sci.* **250**: 261–268.
- Klein, E. (1884) Micro-organisms and disease. *Practitioner* **XXXII**: 321–352.
- Knutsen, E., Johnsborg, O., Quentin, Y., Claverys, J.P. y Håvarstein, L.S. (2006) BOX elements modulate gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: impact on the fine-tuning of competence development. *J. Bacteriol.* **188**: 8307–8312.
- Ko, K.S., Baek, J.Y. y Song, J.H. (2013) Capsular gene sequences and genotypes of "serotype 6E" *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 3395–3399.
- Kolberg, J., Høiby, E.A. y Jantzen, E. (1997) Detection of the phosphorylcholine epitope in streptococci, *Haemophilus* and pathogenic *Neisseriae* by immunoblotting. *Microb. Pathog.* **22**: 321–329.
- Kong, F., Wang, W., Tao, J., Wang, L., Wang, Q., Sabanathan, A. y Gilbert, G.L. (2005) A molecular-capsular-type prediction system for 90 *Streptococcus pneumoniae* serotypes using partial *cpsA-cpsB* sequencing and *wzy*- or *wzx*-specific PCR. *J. Med. Microbiol.* **54**: 351–356.
- Kovaleva, J., Gerhards, L.G. y Möller, A.V. (2012) Endocarditis caused by rare Gram-positive bacteria: investigate for gastrointestinal disorders. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **156**: A4445.
- La Scola, B. (2011) Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11**: 287–298.
- Lacks, S. y Hotchkiss, R.D. (1960) A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* **39**: 508–518.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lang, A.S., Zhaxybayeva, O. y Beatty, J.T. (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 472–482.
- Lanie, J.A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., *et al.* (2007) Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J. Bacteriol.* **189**: 38–51.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.

- Laus, F., Attili, A.R., Cerquetella, M., Spaterna, A., Tesei, B. y Cuteri, V. (2009) Endoscopic findings, microbiological and cytological evaluation of tracheal aspirates in a population of Standardbred horses with poor performances. *Vet. Med. (Praha)* **54**: 444–450.
- Lebon, A., Verkaik, N.J., Labout, J.A.M., de Vogel, C.P., Hooijkaas, H., Verbrugh, H.A., *et al.* (2011) Natural antibodies against several pneumococcal virulence proteins in children during the pre-pneumococcal-vaccine era: the generation R study. *Infect. Immun.* **79**: 1680–1687.
- Lefevre, J.C., Faucon, G., Sicard, A.M. y Gasc, A.M. (1993) DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2724–2728.
- Leonard, R.B. y Carroll, K.C. (1997) Rapid lysis of gram-positive cocci for pulsed-field gel electrophoresis using achromopeptidase. *Diagn. Mol. Pathol.* **6**: 288–291.
- Leung, M.H., Bryson, K., Freystatter, K., Pichon, B., Edwards, G., Charalambous, B.M. y Gillespie, S.H. (2012) Sequotyping: serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR-sequencing strategy. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 2419–2427.
- Liñares, J., Ardanuy, C., Pallares, R. y Fenoll, A. (2010) Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 402–410.
- Llull, D., López, R. y García, E. (2001) Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr. Mol. Med.* **1**: 475–491.
- Llull, D., López, R. y García, E. (2006) Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1250–1256.
- Loeffler, J.M. y Fischetti, V.A. (2006) Lysogeny of *Streptococcus pneumoniae* with MM1 phage: improved adherence and other phenotypic changes. *Infect. Immun.* **74**: 4486–4495.
- Longchamp, P.F., Mauël, C. y Karamata, D. (1994) Lytic enzymes associated with defective prophages of *Bacillus subtilis*: Sequencing and characterization of the region comprising the *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene of prophage PBSX. *Microbiology* **140**: 1855–1867.
- López, R. y García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553–580.
- Lopez, R., Garcia, E. y Ronda, C. (1981) Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 212–223.
- Lopez, R., Garcia, E., Garcia, P., Ronda, C. y Tomasz, A. (1982) Choline-containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **151**: 1581–1590.
- López, R., Ronda, C. y García, E. (1990) Autolysins are direct involved in the bactericidal effect caused by penicillin in wild type and in tolerant pneumococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 317–322.
- López, R. y García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553–580.
- López, R., García, E., García, P. y García, J.L. (2004) Cell wall hydrolases. En *The Pneumococcus*. Tuomanen, E.I., Mitchell, T.J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 75–88.
- López Roa, P., Sánchez Carrillo, C., Marín, M., Romero, F., Cercenado, E. y Bouza, E. (2013) Value of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight for routine identification of viridans group streptococci causing bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**: 438–444.
- Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. y Liddington, R. (2011) Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins. *J. Biol. Chem.* **286**: 34392–34403.
- Lucas, R., Czikota, I., Sridhar, S., Zemskov, E., Gorshkov, B., Siddaramappa, U., *et al.* (2013) Mini-review: novel therapeutic strategies to blunt actions of pneumolysin in the lungs. *Toxins* **5**: 1244–1260.
- Lund, E. y Henrichsen, J. (1978) Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol.* **12**: 241–262.

BIBLIOGRAFÍA

- Lyall, N.W. y Odell, H.R. (1939) Production and standardization of diagnostic antipneumococcus sera. *Am. J. Hyg.* **29**: 103–106.
- Madhour, A., Maurer, P. y Hakenbeck, R. (2011) Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Iran. J. Microbiol.* **3**: 58–67.
- Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Coulter, W.A., Mason, C., Dooley, J.S.G., Lowery, C.J. y Moore, J.E. (2010) The viridans group streptococci. *Rev. Med. Microbiol.* **21**: 69–79.
- Maeda, Y., Elborn, J.S., Parkins, M.D., Reihill, J., Goldsmith, C.E., Coulter, W.A., *et al.* (2011) Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) including *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J. Cyst. Fibros.* **10**: 133–139.
- Makino, S., Yamamoto, K., Murakami, S., Shirahata, T., Uemura, K., Sawada, T., *et al.* (1998) Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microb. Pathog.* **25**: 101–109.
- Malik, I., Ghosh, S., Nutt, C., Macdonald, A., Bal, A.M. y Lollier, A. (2010) *Gemella haemolysans* bacteremia in a patient with solitary liver abscess. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**: 438–441.
- Mao, Y., Fan, H. y Lu, C. (2008) Immunoproteomic assay of extracellular proteins in *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**: 103–109.
- Marimon, J.M., Monasterio, A., Ercibengoa, M., Pascual, J., Prieto, I., Simón, L. y Perez-Trallero, E. (2010) Antibody microarray typing, a novel technique for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *J. Microbiol. Methods* **80**: 274–280.
- Marimon, J.M., Ercibengoa, M., García-Arenzana, J.M., Alonso, M. y Pérez-Trallero, E. (2013) *Streptococcus pneumoniae* ocular infections, prominent role of unencapsulated isolates in conjunctivitis. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**: E298–E305.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J. y Dockrell, D.H. (2008) Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr. Mol. Med.* **8**: 497–509.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., *et al.* (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3479–3483.
- Martin, B., García, P., Castanié, M.P. y Claverys, J.-P. (1995) The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**: 367–379.
- Martín, A.C., López, R. y García, P. (1998) Functional analysis of the two-gene lysis system of the pneumococcal phage Cp-1 in homologous and heterologous host cells. *J. Bacteriol.* **180**: 210–217.
- Martín, V., Mañes-Lázaro, R., Rodríguez, J.M. y Maldonado-Barragán, A. (2011) *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 1048–1052.
- Martín-Galiano, A.J., Balsalobre, L., Fenoll, A. y de la Campa, A.G. (2003) Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3187–3194.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J.C. y Wold, A.E. (2008) Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect. Immun.* **76**: 4079–4087.
- Martner, A., Skovbjerg, S., Paton, J.C. y Wold, A.E. (2009) *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect. Immun.* **77**: 3826–3837.
- McCarty, M. y Avery, O.T. (1946) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J. Exp. Med.* **83**: 89–96.
- McCullers, J.A. (2006) Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 571–582.
- McDaniel, L.S., Sheffield, J.S., Swiatlo, E., Yother, J., Crain, M.J. y Briles, D.E. (1992) Molecular localization of variable and conserved regions of *pspA* and identification of additional *pspA* homologous sequences in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **13**: 261–269.

- Medrano, F.J., Gasset, M., López-Zúmel, C., Usobiaga, P., García, J.L. y Menéndez, M. (1996) Structural characterization of the unligated and choline-bound forms of the major pneumococcal autolysin LytA amidase. Conformational transitions induced by temperature. *J. Biol. Chem.* **271**: 29152–29161.
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., *et al.* (2012) LytA, the major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to the nascent peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **287**: 11018–11029.
- Meng, J.P., Yin, Y.B., Zhang, X.M., Huang, Y.S., Lan, K., Cui, F. y Xu, S.X. (2008) Identification of *Streptococcus pneumoniae* genes specifically induced in mouse lung tissues. *Can. J. Microbiol.* **54**: 58–65.
- Mira, A., Martín-Cuadrado, A.B., D'Auria, G. y Rodríguez-Valera, F. (2010) The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int. Microbiol.* **13**: 45–57.
- Mitchell, J. (2011) *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol. Oral. Microbiol.* **26**: 89–98.
- Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M., *et al.* (2009) Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep.* **10**: 246–251.
- Mollerach, M. y García, E. (2000) The *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* that codes for a UDP-glucose pyrophosphorylase is highly polymorphic and suitable for molecular typing and phylogenetic studies. *Gene* **260**: 77–86.
- Mollerach, M., López, R. y García, E. (1998) Characterization of the *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *J. Exp. Med.* **188**: 2047–2056.
- Morales, M., García, P., de la Campa, A.G., Liñares, J., Ardanuy, C. y García, E. (2010) Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene encoding the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **192**: 2624–2632.
- Moreillon, P. y Majcherzyk, P.A. (2003) Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**: 632–641.
- Moreillon, P. y Tomasz, A. (1988) Penicillin resistance and defective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence for two kinds of antibiotic pressure operating in the clinical environment. *J. Infect. Dis.* **157**: 1150–1157.
- Morens, D.M., Folkers, G.K. y Fauci, A.S. (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242–249.
- Morgenroth, J. y Levi, R. (1911a) Chemotherapie der pneumokokkeninfektion. *Berl. Klin. Wochenschr.* **34**: 1560–1561.
- Morgenroth, J. y Levi, A. (1911b) Chemotherapie der pneumokokkeninfektion. II. Mitteilung. *Berl. Klin. Wochenschr.* **44**: 1979–1983.
- Morrison, D.A. (1978) Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex. *J. Bacteriol.* **136**: 548–557.
- Mortier-Barrière, I., de Saizieu, A., Claverys, J.P. y Martin, B. (1998) Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **27**: 159–170.
- Moscoco, M. y García, E. (2009) Transcriptional regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatic analysis. *DNA Res.* **16**: 177–186.
- Moscoco, M., Obregón, V., López, R., García, J.L. y García, E. (2005) Allelic variation of the polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8706–8713.
- Moscoco, M., Domenech, M. y García, E. (2010). Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* **77**: 1052–1064.

BIBLIOGRAFÍA

- Moscoso, M., Domenech, M. y García, E. (2011) Vancomycin tolerance in Gram-positive cocci. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**: 640–650.
- Mosser, J.L. y Tomasz, A. (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**: 287–298.
- Narikawa, S., Suzuki, Y., Takahashi, M., Furukawa, A., Sakane, T. y Mizushima, Y. (1995) *Streptococcus oralis* previously identified as uncommon '*Streptococcus sanguis*' in Behçet's disease. *Arch. Oral Biol.* **40**: 685–690.
- Nelson, D.C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D.G., Dong, S., y Donovan, D.M. (2012) Endolysins as antimicrobials. *Adv. Virus Res.* **83**: 299–365.
- Neufeld, F. (1900) Ueber eine spezifische bakteriolytische wirkung der galle. *Z. Hyg. Infektionskrankh.* **34**: 454–464.
- Neufeld, F. (1902) Ueber die agglutination der pneumokokken und über die theorien der agglutination. I. Die agglutination der pneumokokken. *Z. Hyg. Infektionskrankh.* **40**: 54–72.
- Neuhaus, F.C. y Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 686–723.
- Ng, E.W., Costa, J.R., Samiy, N., Ruoff, K.L., Connolly, E., Cousins, F.V. y D'Amico, D.J. (2002) Contribution of pneumolysin and autolysin to the pathogenesis of experimental pneumococcal endophthalmitis. *Retina* **22**: 622–632.
- Nielsen, R. (2005) Molecular signatures of natural selection. *Annu. Rev. Genet.* **39**: 197–218.
- Obert, C., Sublett, J., Kaushal, D., Hinojosa, E., Barton, T., Tuomanen, E.I. y Orihuela, C.J. (2006) Identification of a candidate *Streptococcus pneumoniae* core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. *Infect. Immun.* **74**: 4766–4777.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., *et al.* (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**: 893–902.
- Obregón, V., García, P., García, E., Fenoll, A., López, R. y García, J.L. (2002) Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2545–2554.
- Obregón, V., García, J.L., García, E., López, R. y García, P. (2003a) Genome organization and molecular analysis of the temperate bacteriophage MM1 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**: 2362–2368.
- Obregón, V., García, P., López, R. y García, J.L. (2003b) VO1, a temperate bacteriophage of the type 19A multiresistant epidemic 8249 strain of *Streptococcus pneumoniae*: analysis of variability of lytic and putative C5 methyltransferase genes. *Microb. Drug Resist.* **9**: 7–15.
- Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T. y Shimoji, Y. (2011) The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J. Bacteriol.* **193**: 2959–2971.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Briles, D.E., Cook, J. y Paton, J.C. (2007) Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **75**: 350–357.
- Oliver, M.B., Jones, C., Larson, T.R., Calix, J.J., Zartler, E.R., Yother, J. y Nahm, M.H. (2013a) *Streptococcus pneumoniae* serotype 11D has a bispecific glycosyltransferase and expresses two different capsular polysaccharide repeating units. *J. Biol. Chem.* **288**: 21945–21954.
- Oliver, M.B., van der Linden, M.P., Kuntzel, S.A., Saad, J.S. y Nahm, M.H. (2013b) Discovery of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6 variants with glycosyltransferases synthesizing two differing repeating units. *J. Biol. Chem.* **288**: 25976–25985.
- Orihuela, C.J., Gao, G., Francis, K.P., Yu, J. y Tuomanen, E.I. (2004) Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **190**: 1661–1669.

- Paradiso, P.R. (2011) Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for infants and children. *Clin. Infect. Dis.* **52**: 1241–1247.
- Paradiso, P.R. (2012) Pneumococcal conjugate vaccine for adults: a new paradigm. *Clin. Infect. Dis.* **55**: 259–264.
- Park, I.H., Kim, K.-H., Andrade, A.L., Briles, D.E., McDaniel, L.S. y Nahm, M.H. (2012) Nontypeable pneumococci can be divided into multiple *cps* types, including one type expressing the novel gene *pspK*. *mBio* **3**: e00035-00012.
- Pasteur (1881) Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull. Acad. Med. (Paris)* **10**: 94–103.
- Pasteur, L., Chamberland, C. y Roux, P.P.E. (1881) Sur une maladie nouvelle, provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **92**: 159–165.
- Patel, P.B., Diaz, M.C.G., Bennett, J.E. y Attia, M.W. (2007) Clinical features of bacterial conjunctivitis in children. *Acad. Emerg. Med.* **14**: 1–5.
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., *et al.* (2010) Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 576–581.
- Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S. y Hermoso, J.A. (2012) Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 221–245.
- Pillai, D., Shahinas, D., Buzina, A., Pollock, R., Lau, R., Khairnar, K., *et al.* (2009) Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* **10**: 642.
- Podvin, L., Reyssset, G., Hubert, J. y Sebald, M. (1988) Presence of choline in teichoic acid of *Clostridium acetobutylicum* NI-4 and choline inhibition of autolytic functions. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1603–1609.
- Porat, N., Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Shuval, D.S., Treffer, R., Segev, O., *et al.* (2006) The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **194**: 689–696.
- Porter, R.D., Shoemaker, N.B., Rampe, G. y Guild, W.R. (1979) Bacteriophage-associated gene transfer in pneumococcus: transduction or pseudotransduction? *J. Bacteriol.* **137**: 556–567.
- Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P. y Trieu-Cuot, P. (1998) Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 41–47.
- Prevaes, S.M.P.J., van Wamel, W.J.B., de Vogel, C.P., Veenhoven, R.H., van Gils, E.J.M., van Belkum, A., *et al.* (2012) Nasopharyngeal colonization elicits antibody responses to staphylococcal and pneumococcal proteins that are not associated with a reduced risk of subsequent carriage. *Infect. Immun.* **80**: 2186–2193.
- Punta, M., Coggill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., *et al.* (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **40**: D290–D301.
- Ramirez, M., Severina, E. y Tomasz, A. (1999) A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3618–3625.
- Ramos-Sevillano, E., Rodríguez-Sosa, C., Díez-Martínez, R., Giménez, M.-J., Olmedillas, E., García, P., *et al.* (2012) Macrolides and β -lactams antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 5534–5540.
- Ramos Sevillano, E. (2013) Enfermedad neumocócica invasiva: mecanismos moleculares de patogenicidad y protección. (Tesis doctoral: Universidad Complutense de Madrid).
- Rane, L. y Subbarow, Y. (1940a) Choline, pantothenic acid, and nicotinic acid as essential growth factors for pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **134**: 455–456.
- Rane, L. y Subbarow, Y. (1940b) Nutritional requirements of the pneumococcus. 1. Growth factors for types I, II, V, VII, VIII. *J. Bacteriol.* **40**: 695–704.

BIBLIOGRAFÍA

- Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., *et al.* (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**: 495–503.
- Reichmann, P., Nuhn, M., Denapate, D., Brückner, R., Henrich, B., Maurer, P., *et al.* (2011) Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. *J. Bacteriol.* **193**: 2888–2889.
- Roberts, A.P. y Mullany, P. (2011) Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 856–871.
- Romero, A., Lopez, R. y García, P. (1990a) Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB-3 amidase reveals high homology with the major host autolysin. *J. Bacteriol.* **172**: 5064–5070.
- Romero, A., Lopez, R. y García, P. (1990b) Characterization of the pneumococcal bacteriophage HB-3 amidase: cloning and expression in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **64**: 137–142.
- Romero, P., López, R. y García, E. (2004a) Characterization of LytA-like *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **186**: 8229–8239.
- Romero, P., López, R. y García, E. (2004b) Genomic organization and molecular analysis of the inducible prophage EJ-1, a mosaic myovirus from an atypical pneumococcus. *Virology* **322**: 239–252.
- Romero, P. (2005) Los bacteriófagos de *Streptococcus mitis* revelan peculiaridades evolutivas y fisicoquímicas de la principal autolisina de *Streptococcus pneumoniae*. (Tesis doctoral: Universidad Complutense de Madrid).
- Romero, P., López, R. y García, E. (2007) Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **282**: 17729–17737.
- Romero, P., Croucher, N.J., Hiller, N.L., Hu, F.Z., Ehrlich, G.D., Bentley, S.D., *et al.* (2009a) Comparative genomic analysis of ten *Streptococcus pneumoniae* temperate bacteriophages. *J. Bacteriol.* **191**: 4854–4862.
- Romero, P., García, E. y Mitchell, T.J. (2009b) Development of a prophage typing system and analysis of prophage carriage in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1642–1649.
- Ronda, C., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1987) Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **164**: 621–624.
- Ronda, C., García, J. y López, R. (1991) Teichoic acid choline esterase, a novel hydrolytic activity in *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 289–294.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A. y Measure, H.R. (1997) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819–829.
- Rukke, H.V., Hegna, I.K. y Petersen, F.C. (2012) Identification of a functional capsule locus in *Streptococcus mitis*. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 95–108.
- Sabelnikov, A.G., Greenberg, B. y Lacks, S.A. (1995) An extended –10 promoter alone directs transcription of the *DprII* operon of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **250**: 144–155.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Beato, A.R., Ronda, C. y Garcia, J.L. (1995) Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain: molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J. Bacteriol.* **177**: 1098–1103.
- Sánchez-Beato, A.R. y Garcia, J.L. (1996) Molecular characterization of a family of choline-binding proteins of *Clostridium beijerinckii* NCIB 8052. Evolution and gene redundancy in prokaryotic cell. *Gene* **180**: 13–21.
- Sánchez-Beato, A.R., López, R. y García, J.L. (1998) Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 207–214.

- Sánchez-Puelles, J.M., Ronda, C., García, J.L., García, P., López, R. y García, E. (1986) Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289–293.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L. y García, E. (1992) Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **203**: 153–159.
- Sanders, M.S., van Well, G.T.J., Ouburg, S., Morré, S.A. y van Furth, A.M. (2011) Genetic variation of innate immune response genes in invasive pneumococcal and meningococcal disease applied to the pathogenesis of meningitis. *Genes Immun.* **12**: 321–334.
- São-José, C., Parreira, T., Vieira, G., y Santos, M.A. (2000) The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a *cis*-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J. Bacteriol.* **182**: 5823–5831.
- Schleifer, K.H. (2009) Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**: 533–542.
- Schleifer, K.H. y Kilpper-Bälz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 31–34.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. y Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 183–195.
- Schmelcher, M., Donovan, D.M. y Loessner, M.J. (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* **7**: 1147–1171.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. y Whittam, T.S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 873–884.
- Selva, L., Ciruela, P., Esteva, C., de Sevilla, M.F., Codina, G., Hernández, S., *et al.* (2012) Serotype 3 is a common serotype causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years old, as identified by real-time PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**: 1487–1495.
- Shah, D.S., Joucla, G., Remaud-Simeon, M. y Russell, R.R. (2004) Conserved repeat motifs and glucan binding by glucanases of oral streptococci and *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **186**: 8301–8308.
- Shahinas, D., Tamber, G.S., Arya, G., Wong, A., Lau, R., Jamieson, F., *et al.* (2011) Whole-genome sequence of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolate IS7493. *J. Bacteriol.* **193**: 6102–6103.
- Shahinas, D., Thornton, C.S., Tamber, G.S., Arya, G., Wong, A., Jamieson, F.B., *et al.* (2013) Comparative genomic analyses of *Streptococcus pseudopneumoniae* provide insight into virulence and commensalism dynamics. *PLoS One* **8**: e65670.
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R. y García, P. (1997) The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol. Microbiol.* **25**: 717–725.
- Shi, Y., Mowery, R.A., Ashley, J., Hentz, M., Ramirez, A.J., Bilgicer, B., *et al.* (2012) Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control sufanctant binding. *Protein Sci.* **21**: 1197–1209.
- Shiroza, T., Ueda, S. y Kuramitsu, H.K. (1987) Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **169**: 4263–4270.
- Siboo, I.R., Bensing, B.A. y Sullam, P.M. (2003) Genomic organization and molecular characterization of SM1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus mitis*. *J. Bacteriol.* **185**: 6968–6975.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Systems Biol.* **7**: 539.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J. y Chandler, M. (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**: D32–D36.

BIBLIOGRAFÍA

- Silva, N.A., McCluskey, J., Jefferies, J.M.C., Hinds, J., Smith, A., Clarke, S.C., *et al.* (2006) Genomic diversity between strains of the same serotype and multilocus sequence type among pneumococcal clinical isolates. *Infect. Immun.* **74**: 3513–3518.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V. y Sneath, P.H.A. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 225–420.
- Smith, B.L. y Hostetter, M.K. (2000) C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **182**: 497–508.
- Stackebrandt, E. y Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846–849.
- Sternberg, G.M. (1881) A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl. Board Health Bull.* **2**: 781–783.
- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**: 462–477.
- Swiatlo, E., McDaniel, L.S. y Briles, D.E. (2004) Choline-binding proteins. En *The Pneumococcus*. Tuomanen, E.I., Mitchell, T.J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 49–60.
- Tabor, S. (1990) Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. In *Current protocols in molecular biology*. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (eds). New York: Green Publishing Associates Inc. and John Wiley & Sons, pp. 16.12.11–16.12.11.
- Tai, S.S. (2006) *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**: 139–153.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.
- Tang, L. y Liu, S.-L. (2012) The 3Cs provide a novel concept of bacterial species: messages from the genome as illustrated by *Salmonella*. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**: 67–72.
- Tarragó, D., Fenoll, A., Sánchez-Tatay, D., Arroyo, L.A., Muñoz-Almagro, C., Esteve, C., *et al.* (2008) Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 828–834.
- Tarragó, D., Aguilar, L., García, R., Gimenez, M.-J., Granizo, J.-J. y Fenoll, A. (2011) Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from children in Spain, 1990 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 2297–2302.
- Temime, L., Boelle, P.Y., Opatowski, L. y Guillemot, D. (2008) Impact of capsular switch on invasive pneumococcal disease incidence in a vaccinated population. *PLoS One* **3**: e3244.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., *et al.* (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498–506.
- Thomas, J.C., Kong, Y., Sabharwal, V., Pelton, S.I. y Pettigrew, M.M. (2011) *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C: an intra- and interclonal complex comparison. *J. Bacteriol.* **193**: 3409–3410.
- Timoney, J.F. (2004) The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.* **35**: 397–409.
- Tocci, N., Iannelli, F., Bidossi, A., Ciusa, M.L., Decorosi, F., Viti, C., *et al.* (2013) Functional analysis of pneumococcal drug efflux pumps associates the MATE DinF transporter with quinolone susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 248–253.
- Tomasz, A. (1967) Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* **157**: 694–697.
- Tomasz, A., Albino, A. y Zanati, E. (1970) Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* **227**: 138–140.
- Tomasz, A. y Westphal, M. (1971) Abnormal autolytic enzyme in a pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2627–2630.

- Tomasz, A., Zanati, E. y Ziegler, R. (1971) DNA uptake during genetic transformation and the growing zone of the cell envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 1848–1852.
- Tomita, Y., Okamoto, A., Yamada, K., Yagi, T., Hasegawa, Y. y Ohta, M. (2011) A new microarray system to detect *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**: 352736.
- Tong, H., Gao, X. y Dong, X. (2003) *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1101–1104.
- Tuomanen, E.I. (2000) Pathogenesis of pneumococcal inflammation: otitis media. *Vaccine* **19**: S38–S40.
- Ueda, S., Shiroza, T. y Kuramitsu, H.K. (1988) Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene* **69**: 101–109.
- UNICEF y WHO (2006) Pneumonia: the forgotten killer of children. http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf.
- Usobiaga, P., Medrano, F.J., Gasset, M., García, J.L., Saiz, J.L., Rivas, G. et al. (1996) Structural organization of the major autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 6832–6838.
- Vammen, B. (1939) Serological variants of pneumococcus types 9 and 10. *J. Immunol.* **37**: 359–365.
- van der Linden, M., Al-Lahham, A., Nicklas, W. y Reinert, R.R. (2009) Molecular characterization of pneumococcal isolates from pets and laboratory animals. *PLoS One* **4**: e8286.
- Varea, J., Saiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Medrano, F.J., Arrondo, J.L.R. et al. (2000) Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase? *J. Biol. Chem.* **275**: 26842–26855.
- Vernatter, J. y Pirofski, L.-a. (2013) Current concepts in host–microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **26**: 277–283.
- Volanakis, J.E. y Kaplan, M.H. (1971) Specificity of C–reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**: 612–614.
- Vollmer, W. y Tomasz, A. (2001) Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1610–1622.
- Vos, M. (2011) A species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends Microbiol.* **19**: 1–7.
- Waltman, W.D., McDaniel, L.S., Gray, B.M. y Briles, D.E. (1990) Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **8**: 61–69.
- Wang, K. y Samudrala, R. (2006) Incorporating background frequency improves entropy-based residue conservation measures. *BMC bioinformatics* **7**: 385.
- Wang, I.-N., Smith, D.L. y Young, R. (2000) Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 799–825.
- Wang, X.-Y., Kilgore, P.E., Lim, K.A., Wang, S.-M., Lee, J., Deng, W., et al. (2011) Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2011**: 146376.
- Wei, H. y Håvarstein, L.S. (2012) Fratricide is essential for efficient gene transfer between pneumococci in biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5897–5905.
- Weichselbaum, A. (1886) Ueber die aetiologie der acuten lungen- und rippenfellentzündungen. *Med. Jahrb* **82**: 483–554.
- Weidenmaier, C. y Peschel, A. (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 276–287.
- Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A.M., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Rückinger, S., et al. (2010) Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **51**: 692–699.
- Weinberger, D.M., Malley, R. y Lipsitch, M. (2011) Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* **378**: 1962–1973.
- Weiser, J.N. (2010) The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J. Mol. Med.* **88**: 97–102.
- Welch, H., Bormand, E.K. y Mickle, F.L. (1939) Preparation of diagnostic antipneumococcus sera. *Am. J. Public Health* **29**: 35–42.

BIBLIOGRAFÍA

- Werno, A.M., Christner, M., Anderson, T.P. y Murdoch, D.R. (2012) Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 2863–2867.
- Weycker, D., Strutton, D., Edelsberg, J., Sato, R. y Jackson, L.A. (2010) Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. *Vaccine* **28**: 4955–4960.
- Whatmore, A.M. y Dowson, C.G. (1999) The autolysin-encoding gene (*lytA*) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. *Infect. Immun.* **67**: 4551–4556.
- Whatmore, A.M., King, S.J., Doherty, N.C., Sturgeon, D., Chanter, N. y Dowson, C.G. (1999) Molecular characterization of equine isolates of *Streptococcus pneumoniae*: natural disruption of genes encoding the virulence factors pneumolysin and autolysin. *Infect. Immun.* **67**: 2776–2782.
- Whatmore, A.M., Efstratiou, A., Pickerill, A.P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., *et al.* (2000) Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.* **68**: 1374–1382.
- Whiley, R.A., Fraser, H.Y., Douglas, C.W.I., Hardie, J.M., Williams, A.M. y Collins, M.D. (1990) *Streptococcus parasanguis* sp. nov., an atypical viridans *Streptococcus* from human clinical specimens. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**: 115–122.
- Whiley, R.A. y Hardie, J.M. (2009) Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22AL. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. y Whitman, W.B. (eds). pp. 655–711.
- White, J.C. y Niven, C.F., Jr. (1946) *Streptococcus* s.b.e.: a streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. *J. Bacteriol.* **51**: 717–722.
- Whitmore, S.E. y Lamont, R.J. (2011) The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol. Microbiol.* **81**: 305–314.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. y Schubert, S. (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 965–974.
- Wigley, D.B. (2013) Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 9–13.
- Willcox, M.D., Zhu, H. y Knox, K.W. (2001) *Streptococcus australis* sp. nov., a novel oral streptococcus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1277–1281.
- Woo, P.C.Y., Tam, D.M.W., Leung, K.-W., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Wong, M.K.M. y Yuen, K.-Y. (2002) *Streptococcus sinensis* sp. nov., a novel species isolated from a patient with infective endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 805–810.
- Wood, J.L.N., Newton, J.R., Chanter, N. y Mumford, J.A. (2005) Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 120–126.
- Wren, B.W. (1991) A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol. Microbiol.* **5**: 797–803.
- Wren, B.W., Clayton, C.L., Tabagchali, S. (1990) Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A gene fragment and detection of toxigenic strains by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 1–6.
- Wyres, K.L., Lambertsen, L.M., Croucher, N.J., McGee, L., von Gottberg, A., Liñares, J., *et al.* (2013) Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. *J. Infect. Dis.* **207**: 439–449.
- Xie, Z.-R. y Hwang, M.J. (2012) Ligand-binding site prediction using ligand-interacting and binding site-enriched protein triangles. *Bioinformatics* **28**: 1579–1585.
- Xu, Q., Kaur, R., Casey, J.R., Sabharwal, V., Pelton, S. y Pichichero, M.E. (2011) Nontypeable *Streptococcus pneumoniae* as an otopathogen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69**: 200–204.
- Xu, M., Struck, D., Deaton, J., Wang, I.N. y Young, R. (2004) A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 6415–6420.

- Yother, J. y Briles, D.E. (1992) Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J. Bacteriol.* **174**: 601–609.
- Yother, J. (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**: 563–581.
- Young, R. (2005) Phage lysis. En *Phages, Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Waldor, M.K., Friedman, D.I., and Adhya, S. L. (eds). Washington, DC: ASM Press, American Society for Microbiology, pp. 92–127.
- Zbinden, A., Mueller, N.J., Tarr, P.E., Spröer, C., Keller, P.M. y Bloemberg, G.V. (2012) *Streptococcus tigurinus* sp. nov., isolated from blood of patients with endocarditis, meningitis and spondylodiscitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 2941–2945.
- Zhang, J.R., Idanpaan-Heikkilä, I., Fischer, W. y Tuomanen, E.I. (1999) Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol. Microbiol.* **31**: 1477–1488.
- Zhang, M., Yan, L., Zhu, G., Holifield, M., Todd, D. y Zhang, S. (2013) Isolation and characterization of *Streptococcus troglodytidis* sp. nov., from a foot abscess of a chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 63:449–453.

VIII. ANEXO

Listado de alelos *lytA* de aislados de neumococo y otros SGM así como de sus fagos

Alelo	Identificador de secuencia	Cepa
1_SPN	gb AE007317.1	R6
	gb CP000410.1	D39
	emb Z34303.1	R800
	gb M13812.1 STRLYTPN	R6st
	gb ALCT01000004.1	GA17484
	gb ALCC01000009.1	SPAR27
	gb AIKZ01000005.1	GA47461
	gb AGPT01000006.1	GA47373
	gb AGIC01000042.1	R6M2-PG
2_SPN	gb AE005672.3	TIGR4
	gb CP000919.1	JJA
	gb ALCW01000008.1	GA62681
	gb ALCJ01000007.1	GA04672
	gb ALCF01000009.1	SPAR55
	gb ALCE01000006.1	SPAR48
	gb ALBO01000001.1	2082170
	gb ALBH01000012.1	2080076
	gb ALAY01000014.1	2070035
	gb AILS01000014.1	GA17457
	gb AILN01000013.1	GA14373
	gb AILA01000009.1	GA47522
	gb AIKY01000005.1	GA47210
	gb AIKW01000010.1	GA44386
	gb AIKR01000005.1	GA18068
	gb AIKN01000010.1	GA06083
	gb AIKL01000007.1	GA04175
	gb AIKK01000018.1	GA02714
	gb AIKJ01000012.1	GA02270
	gb AIKA01000019.1	GA40410
	gb AIJX01000007.1	GA40183
	gb AIJW01000020.1	EU-NP05
	gb AIJS01000009.1	GA43264
	gb AGQL01000012.1	NorthCarolina6A-23
	gb AGQH01000014.1	EU-NP01
	gb AGQD01000008.1	GA47751
	gb AGQC01000009.1	NP127
	gb AGQB01000009.1	Netherlands15B-37
	gb AGPV01000009.1	GA47439
	gb AGPS01000013.1	GA47360
	gb AGPN01000012.1	GA41437
	gb AGPM01000006.1	GA41277
	gb AGPK01000009.1	GA19077
	gb AGPJ01000008.1	GA17971
	gb AGOV01000009.1	GA11426
	gb AGOT01000003.1	GA07643
	gb AGON01000014.1	6963-05

ANEXO

	gb AGOM01000010.1	5787-06
	gb AGOK01000014.1	GA49447
	gb AGOJ01000014.1	GA41410
	gb AGOI01000013.1	GA44500
	gb AGOF01000008.1	6901-05
	gb AGOC01000008.1	GA44452
	gb AGOB01000010.1	GA43265
	gb AGNU01000017.1	GA11184
	gb AFGS01000006.1	GA47368
	gb AFCA01000152.1	ND6012
	gb AFBZ01000081.1	BR1064
	gb ABGG01000012.1	CDC3059-06
	gb ABGF01000008.1	CDC0288-04
	gb ABFS01000011.1	CDC1873-00
	gb ABAA01000016.1	SP6-BS73
3_SPN	gb AF345844.1 AF345844	147
4_SPN	emb HG514154.1	8249
5_SPN	gb CP002176.1	670-6B
6_SPN	emb FQ312030.1	INV104
	emb FQ312042.1	SPN033038
	emb FQ312039.1	SPN032672
	emb CACJ01000029.1	SPN061370
	gb ALJW01000001.1	PCS8235
	gb AKQW01000010.1	PCS8203
	gb AKQV01000012.1	PCS8106
	gb AFGR01000004.1	GA47901
7_SPN	emb AJ243403.1	PN58
8_SPN	emb AJ243404.1	VA1
9_SPN	emb AJ243405.1	CL18
10_SPN	gb ALCX01000005.1	GA58981
	gb ALCO01000013.1	GA56348
	gb ALBG01000019.1	2061376
	gb ALAW01000022.1	2090008
	gb AGPA01000015.1	GA13637
11_SPN	emb AJ243407.1	PN15
12_SPN	emb AJ243408.1	234
	emb AJ243409.1	233
13_SPN	gb ASZY01000008.1	1779n23_04
	gb AQTR01000092.1	1542
	gb AQTN01000005.1	2009
	gb ALCM01000009.1	GA58771
	gb ALCK01000008.1	GA04216
	gb AILO01000009.1	GA17719
	gb AILK01000006.1	GA08825
	gb AILJ01000006.1	GA02506
	gb AILH01000005.1	GA05578
	gb AILE01000002.1	GA49194

gb AILD01000011.1	GA47760
gb AIRC01000009.1	GA47628
gb AIKP01000007.1	GA13430
gb AIKO01000005.1	GA07914
gb AIKM01000007.1	GA05248
gb AIKG01000008.1	EU-NP03
gb AIKF01000008.1	EU-NP02
gb AIKE01000005.1	4075-00
gb AIKD01000006.1	7879-04
gb AIRC01000005.1	GA19923
gb AIJY01000028.1	8190-05
gb AIJV01000014.1	GA11856
gb AIJU01000010.1	5652-06
gb AIJT01000013.1	7533-05
gb AGQF01000006.1	NP112
gb AGQE01000009.1	5185-06
gb AGPX01000013.1	GA47778
gb AGPW01000010.1	GA47688
gb AGPO01000006.1	GA41565
gb AGPL01000014.1	GA19451
gb AGPI01000011.1	GA17371
gb AGPF01000006.1	GA16833
gb AGPE01000008.1	GA16242
gb AGPD01000004.1	GA16121
gb AGPC01000011.1	GA14798
gb AGPB01000007.1	GA13856
gb AGOY01000006.1	GA13455
gb AGOW01000011.1	GA11663
gb AGOU01000008.1	GA11304
gb AGOS01000010.1	NP170
gb AGOQ01000009.1	GA44378
gb AGOO01000010.1	GA18523
gb AGOL01000012.1	GA41538
gb AGOG01000011.1	7286-06
gb AGOE01000013.1	GA16531
gb AGOD01000007.1	GA49138
gb AGNZ01000013.1	GA47281
gb AGNY01000010.1	GA44288
gb AGNX01000009.1	6735-05
gb AGNW01000004.1	4027-06
gb AFGT01000004.1	GA41317
gb AFGA01000009.1	GA17545
gb ADNO01000008.1	SV36
gb ADNN01000008.1	SV35
gb ACNV01000155.1	Canada MDR_19F
gb ACNU01000124.1	Canada MDR_19A
gb ABXO01000033.1	459-5
gb ABGH01000008.1	MLV-016
gb ABAE01000010.1	SP18-BS74
ref NC_017769.1	ST556

ANEXO

	ref NC_014251.1	TCH8431/19A
	ref NC_012469.1	Taiwan19F-14
	ref NC_011900.1	ATCC 700669
	emb AJ490805.2	949
	gb AUYK01000003.1	Spain6B
	gb AUYL01000006.1	Sp67
	gb AUYF01000041.1	ICE44
	gb AUYE01000066.1	ICE59
14_SPN	emb FM865975.1	S3
15_SPN	emb AM113493.1	ST344
	gb ASJF01000010.1	MNZ85
16_SPN	emb AM113494.1	ST942
	gb ASJO01000001.1	MNZ14
17_SPN	emb FQ312027.1	OXC141
	emb FQ312041.2	SPN994038
	emb FQ312044.2	SPN994039
	emb FQ312043.1	SPN034183
	emb CACH01000021.1	SPN021198
	gb AGQK01000005.1	GA19690
	gb AGQI01000006.1	GA07228
	gb AAZZ01000010.1	SP3-BS71
18_SPN	gb ALBA01000018.1	2070109
	gb ALAZ01000017.1	2070108
	gb AILP01000011.1	GA40028
	gb AILG01000007.1	NP141
	gb AGPR01000013.1	GA47283
	gb ABFT01000024.1	CDC1087-00
19_SPN	emb FQ312029.1	INV200
	emb FQ312045.1	SPN034156
	emb FM865976.1	Tupelo
	gb CP001033.1	CGSP14
	emb CACI01000019.1	SPN072838
	gb ALCS01000006.1	GA19998
	gb ALCQ01000011.1	GA58581
	gb ALCP01000009.1	GA56113
	gb ALCI01000008.1	GA17301
	gb ALCD01000010.1	SPAR95
	gb ALBD01000022.1	2070531
	gb ALBC01000029.1	2070425
	gb ALII01000005.1	England14-9
	gb AILF01000007.1	GA49542
	gb AIKU01000006.1	GA43257
	gb AIKS01000015.1	GA19101
	gb AGQJ01000007.1	GA08780
	gb AGQA01000003.1	GA54644
	gb AGPU01000005.1	GA47388
	gb AGPQ01000008.1	GA43380
	gb AGPP01000008.1	GA41688
	gb AGOX01000010.1	GA13338

	gb AGOR01000022.1	GA44511
	gb AFGB01000007.1	GA17570
	gb ABWU01000011.1	SP9v-BS293
	gb ABWQ01000008.1	SP14-BS292
	gb ABWC01000011.1	BS397
	gb ABWB01000006.1	BS457
	gb ABWA01000002.1	BS458
	gb ABGE01000012.1	SP195
	gb ABAF01000008.1	SP19-BS75
	gb AUYH01000008.1	1417
	gb AUYJ01000033.1	439-1
	gb AUYI01000005.1	88-1
	gb AUYG01000083.1	Spain9v
20_SPN	ref NC_014494.1	AP200
	gb ALCY01000010.1	GA47562
21_SPN	gb ASJW01000006.1	MNZ11
	gb ASJQ01000054.1	MNZ41
	gb ASJP01000003.1	MNZ37
	gb ALBJ01000008.1	2071004
	gb AIKI01000012.1	GA02254
	gb AGOZ01000014.1	GA13494
	gb AGNV01000013.1	GA47502
	gb AGID01000009.1	1974M1-LZD
	gb ADHN01000018.1	BS455
	gb ABZT01000047.1	CCRI 1974M2
	gb ABZC01000110.1	CCRI 1974
	gb ABAD01000012.1	SP14-BS69
	gb AVFA01000058.1	WL400
	gb AUWZ01000003.1	WL677
22_SPN	gb CP001015.1	G54
	gb CP000936.1	Hungary19A-6
	gb CP001845.1	gamPNI0373
	emb CACF01000006.1	SPN74765
	gb ALCU01000007.1	GA62331
	gb ALCN01000005.1	GA54354
	gb ALCG01000007.1	GA52612
	gb AKRK01000104.1	PNI0427
	gb AKRJ01000005.1	PNI0360
	gb AKRF01000002.1	PNI0010
	gb AKRE01000004.1	PNI0009
	gb AKRD01000016.1	PNI0008
	gb AKRB01000005.1	PNI0006
	gb AKRA01000009.1	PNI0002
	gb AILQ01000007.1	GA47794
	gb AIKX01000010.1	GA47179
	gb AGOP01000008.1	GA44194
23_SPN	gb ALBL01000011.1	2080913
	gb ALBE01000014.1	2070768
	gb ALAX01000018.1	2070005

ANEXO

	gb AIKV01000007.1	GA44128
	gb AIKQ01000009.1	GA14688
	gb AGPH01000015.1	GA17328
	gb AGOH01000007.1	NP070
	gb AGOA01000007.1	GA47033
	gb ABAG01000011.1	SP23-BS72
24_SPN	gb CP000920.1	P1031
	emb CACE01000007.1	SPN1041
	gb AKRL01000022.1	PNI0446
	gb AKRH01000007.1	PNI0153
	gb AKRG01000001.1	PNI0076
25_SPN	gb CP000918.1	70585
26_SPN	gb AQTP01000026.1	845
	gb ALCR01000016.1	GA60080
	gb AILL01000006.1	GA05245
	gb AFGD01000014.1	GA41301
27_SPN	gb AIJZ01000013.1	GA13499
	gb AGQG01000007.1	3063-00
	gb AFAX01000007.1	GA04375
28_SPN	emb HG531768.1	7270
29_SPN	emb HG531769.1	8376
30_SPN	gb ALCV01000008.1	GA60132
	gb ALCL01000007.1	GA60190
	gb AIKH01000003.1	EU-NP04
	gb AGPZ01000012.1	GA52306
	gb AFCB01000240.1	PT8114
	gb AFBY01000344.1	07AR0125
31_SPN	gb AIKB01000004.1	GA13224
32_SPN	gb ALBF01000021.1	2072047
33_SPN	gb AQTO01000004.1	801
34_SPN	gb AGPG01000009.1	GA17227
35_SPN	gb AKQZ01000120.1	PCS81218
	gb AKQY01000003.1	PCS70012
	gb AKQX01000006.1	PCS125219
36_SPN	gb ALBM01000008.1	2081074
37_SPN	gb AILM01000015.1	GA13723
	gb AGPY01000009.1	GA47976
38_SPN	gb AILB01000008.1	GA47597
39_SPN	gb AIKT01000015.1	GA40563
40_SPN	gb ALBB01000017.1	2070335
41_SPN	gb ALBP01000011.1	2082239
	gb ALBI01000010.1	2061617
42_SPN	AJUX01000121.1	PNI0159
43_SPN	AJUY01000023.1	PNI0164

44_SPN	gb ALBK01000014.1	2071247
1_SMG	gb S43511.1	<i>S. mitis</i> 101/87
2_SMG	emb AJ252190.1	COL17
3_SMG	emb AJ252192.1	COL16
4_SMG	emb AJ252194.1	COL20
5_SMG	emb AM113495.1 /gb AICS01000084.1 emb AM113496.1 gb AJKE01000001.1 emb AJ252195.1	<i>S. pseudopneumoniae</i> CCUG 49455 ^T /ATCC BAA-960 <i>S. pseudopneumoniae</i> CCUG 48465 <i>S. pseudopneumoniae</i> SK674 COL26
6_SMG	emb AJ252196.1	COL27
7_SMG	emb AJ419973.1	1508/92
8_SMG	emb AJ419974.2	11923/1992
9_SMG	emb AJ419975.1	8224/1994
10_SMG	emb AJ419976.1	10546/1994
11_SMG	emb AJ419977.1	782/1996
12_SMG	emb AJ419978.1	1230/1996
13_SMG	emb AJ419979.1	1283/1996
14_SMG	emb AJ419980.1	1338/1996
15_SMG	emb AJ419981.1	1078/1997
16_SMG	emb AJ419982.1	1383/1997
17_SMG	emb AJ419983.1	1629/1997
18_SMG	emb AM113497.1	578
19_SMG	emb AM113500.1 emb AM113501.1	1504 1956
20_SMG	emb AM113504.1 emb AM113505.1	3072 3198
21_SMG	emb AM113502.1	3137
22_SMG	emb AM113503.1	2410
23_SMG	emb AM113498.1 emb AM113499.1	1237 2859
24_SMG	gb AEDU01000019.1	<i>S. mitis</i> SK564
25_SMG	gb AEDV01000001.1	<i>S. mitis</i> SK597
26_SMG	gb AFQV01000006.1	<i>S. mitis</i> SK1080
27_SMG	gb CP002925.1	<i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493
1_PPH	gb M34652.1 HB3HBLA	HB-3
2_PPH	emb AJ302074.2 gb DQ113772.1 emb FM211187.1	(949)MM1 (DCC1808)MM1 1998 (ATCC 700669) MM1-2008

ANEXO

3_PPH	emb AJ490329.1	(8249) VO1
4_PPH	emb FQ312041.2	SPN994038
	emb FQ312044.2	SPN994039
	emb FQ312027.1	OXC141
	emb FQ312045.1	SPN034156
	emb FQ312043.1	SPN034183
	emb CACH01000022.1	SPN021198
	gb AGQI01000002.1	GA07228
	gb AAZZ01000017.1	SP3-BS71
5_PPH	gb CP000936.1	Hungary19A-6
6_PPH	gb AUYJ01000048.1	439-1
	gb AUYI01000017.1	88-1
	gb AUYH01000068.1	1417
	gb AUYG01000104.1	Spain9V
	gb ALCP01000007.1	GA56113
	gb ALCI01000007.1	GA17301
	gb AILF01000005.1	GA49542
	gb AGQJ01000006.1	GA08780
	gb AGQA01000002.1	GA54644
	gb AGPU01000004.1	GA47388
	gb AGOR01000020.1	GA44511
	gb ABGE01000002.1	SP195
7_PPH	gb AUYG01000061.1	Spain9V
	gb ABGE01000013.1	SP195
8_PPH	gb FJ765451.2	SVMC28 (SV1)
	gb ALAW01000004.1	2090008
	gb AILN01000002.1	GA14373
	gb AIKK01000002.1	GA02714
	gb AIKJ01000002.1	GA02270
	gb AIKJ01000001.1	GA02270
	gb AGQL01000003.1	NorthCarolina6A-23
	gb AGQD01000001.1	GA47751
	gb AGQC01000003.1	NP127
	gb AGPN01000004.1	GA41437
	gb AGPH01000004.1	GA17328
	gb AGOK01000002.1	GA49447
	gb AGOJ01000001.1	GA41410
	gb AFGS01000001.1	GA47368
	gb ABFS01000005.1	CDC1873-00
9_PPH	gb ABAC01000001.1	SP11-BS70
10_PPH	gb ABGG01000020.1	CDC3059-06
	gb ABGG01000014.1	CDC3059-06
	gb ABGG01000015.1	CDC3059-06
11_PPH	gb ABAF01000004.1	SP19-BS75
12_PPH	gb ABAA01000020.1	SP6-BS73
13_PPH	gb ABAG01000010.1	SP23-BS72
14_PPH	gb ABAD01000023.1	SP14-BS69

15_PPH	gb CP002176.1	670-6B
16_PPH	gb CP002176.1	670-6B
17_PPH	gb CP000919.1	JJA
18_PPH	gb CP001845.1	gamPNI0373
	gb CP000920.1	P1031
	emb CACE01000014.1	SPN1041
	gb AKRL01000017.1	PNI0446
	gb AKRK01000011.1	PNI0427
	gb AKRJ01000028.1	PNI0360
	gb AKRH01000010.1	PNI0153
	gb AKRG01000005.1	PNI0076
	gb AKRF01000003.1	PNI0010
	gb AKRE01000005.1	PNI0009
	gb AKRD01000022.1	PNI0008
	gb AKRC01000003.1	PNI0007
	gb AKRB01000001.1	PNI0006
	gb AKRA01000008.1	PNI0002
	gb AKQZ01000109.1	PCS81218
	gb AKQY01000002.1	PCS70012
	gb AKQX01000015.1	PCS125219
19_PPH	gb CP000918.1	70585
20_PPH	emb HG514155.1	625
		3694
		5610
		5986
		6355
		7191
		9157
21_PPH	emb HG514156.1	7796
22_PPH	emb HG514157.1	6993
		8205
		8295
23_PPH	emb HG514158.1	8027
24_PPH	emb HG514159.1	7167
	gb AGNV01000014.1	GA47502
25_PPH	emb HG514160.1	8413
26_PPH	emb HG514161.1	5071
27_PPH	emb HG514162.1	7904
	gb ALBJ01000021.1	2071004
28_PPH	emb HG514163.1	5845
29_PPH	emb HG514164.1	7466
30_PPH	emb FR671408.1	<i>Streptococcus</i> phage 23782
31_PPH	gb ALBK01000002.1	2071247
32_PPH	gb ALBF01000030.1	2072047
33_PPH	gb AGPD01000003.1	GA16121

ANEXO

	gb AGOH01000005.1	NP070
34_PPH	ref NC_010380.1	Hungary19A-6
35_PPH	gb AQTO01000063.1	801
36_PPH	gb ALH01000004.1	GA05578
	gb AIKM01000005.1	GA05248
37_PPH	gb AGPJ01000002.1	GA17971
38_PPH	gb AGQH01000012.1	EU-NP01
39_PPH	gb AGNV01000002.1	GA47502
40_PPH	gb AGOV01000001.1	GA11426
41_PPH	gb AGNV01000010.1	GA47502
42_PPH	gb AGNV01000003.1	GA47502
43_PPH	gb AGOB01000001.1	GA43265
44_PPH	gb AIKX01000009.1	GA47179
45_PPH	gb ALCK01000005.1	GA04216
46_PPH	gb AIJW01000018.1	EU-NP05
47_PPH	gb AGOV01000010.1	GA11426
48_PPH	gb AGOE01000002.1	GA16531
49_PPH	gb AGQH01000019.1	EU-NP01
50_PPH	gb ALBI01000013.1	2061617
51_PPH	ref NC_014494.1	AP200
52_PPH	gb AUYK01000065.1	Spain6B
	gb AGOE01000012.1	GA16531
53_PPH	gb ASJQ01000035.1	MNZ41
54_PPH	gb ALBH01000001.1	2080076
55_PPH	gb AIKV01000008.1	GA44128
56_PPH	gb AQTO01000083.1	801
57_PPH	gb ALCR01000001.1	GA60080
58_PPH	gb AGPT01000005.1	GA47373
59_PPH	gb AGOE01000003.1	GA16531
60_PPH	ref NC_017769.1	ST556
61_PPH	emb CACI01000017.1	SPN072838
62_PPH	gb AVFA01000047.1	WL400
63_PPH	gb AUYL01000076.1	Sp647
64_PPH	gb AIKQ01000010.1	GA14688
65_PPH	gb ASJO01000028.1	MNZ14
66_PPH	gb ALCU01000002.1	GA62231
67_PPH	gb ABWU01000004.1	Sp9v-BS293
	gb ABWQ01000001.1	Sp14-BS292
	gb ABWC01000001.1	BS397
	gb ABWB01000003.1	BS457

	gb ABWA01000001.1	BS458
68_PPH	ref NC_018594.1	SPNA45
69_PPH	ref NC_018594.1	SPNA45
70_PPH	gb ALBL01000015.1	2080913
71_PPH	gb AIKI01000004.1	GA02254
72_PPH	gb AGOZ01000003.1	GA13494
73_PPH	gb AGOL01000005.1	GA41538
74_PPH	gb AUYF01000049.1	ICE44
	gb AUYE01000051.1	ICE59
75_PPH	gb AIJX01000005.1	GA40183
76_PPH	gb AIKI01000013.1	GA02254
77_PPH	gb AGOI01000001.1	GA44500
78_PPH	gb AGOH01000008.1	NP070
79_PPH	gb AQTN01000002.1	2009
	gb AIKQ01000005.1	GA14688
	gb AGPA01000012.1	GA13637
80_PPH	gb AGOZ01000013.1	GA13494
81_PPH	gb AIKT01000004.1	GA40563
82_PPH	gb ALCR01000015.1	GA60080
83_PPH	gb AGOE01000014.1	GA16531
84_PPH	gb AGPN01000010.1	GA41437
85_PPH	gb AIKU01000004.1	GA43257
86_PPH	gb AFGB01000006.1	GA17570
87_PPH	gb ALCS01000005.1	GA19998
88_PPH	gb AJUX01000090.1	PNI0159
89_PPH	gb ALCU01000005.1	GA62331
90_PPH	gb AILE01000001.1	GA49194
	gb AIKG01000002.1	EU-NP03
	gb AFGT01000001.1	GA41317
91_PPH	gb AIKL01000001.1	GA04175
92_PPH	gb ALAY01000001.1	2070035
93_PPH	gb AIKL01000006.1	GA04175
	gb AGPM01000004.1	GA41277
94_PPH	gb AGOI01000011.1	GA44500
95_PPH	gb ALCW01000011.1	GA62681
	gb AIKA01000003.1	GA40410
96_PPH	gb ALCJ01000005.1	GA04672
97_PPH	gb AJUY01000128.1	PNI0164
98_PPH	gb AGPE01000002.1	GA16242
99_PPH	gb AILH01000003.1	GA05578
	gb AIKM01000001.1	GA05248

ANEXO

100_PPH	gb ALCK01000002.1	GA04216
1_SPH	emb AJ609634.1	(EJ-1) <i>S. mitis</i> 101/87
2_SPH	emb AJ617815.1	(φHER) <i>S. mitis</i> HER 1055
3_SPH	emb AJ617816.1	(φB6) <i>S. mitis</i> B6
4_SPH	gb CP002925.1	<i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493
5_SPH	gb AFUU01000005.1 HG514165.1	<i>S. oralis</i> SK313
6_SPH	gb AEPO01000010.1	<i>S. oralis</i> ATCC 49296
7_SPH	gb AEPO01000005.1	<i>S. oralis</i> ATCC 49296
8_SPH	gb AFUO01000001.1	<i>S. mitis</i> bv. 2 str. F0392
9_SPH	gb AFQT01000028.1	<i>S. mitis</i> SK1073
10_SPH	gb AFUT01000001.1	<i>S. infantis</i> SK970
11_SPH	gb AORU01000007.1	<i>S. tigurinus</i> AZ_3a
12_SPH	gb AJKE01000096.1	<i>S. pseudopneumoniae</i> SK674
13_SPH	gb ATAB01000016.1	<i>S. mitis</i> 29/42
14_SPH	gb AEDU01000020.1	<i>S. mitis</i> SK564

